Aus dem Institut für Parasitologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Differentielle Gentranskription bei Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten Larven von *Dictyocaulus viviparus*

T H E S E

zur Erlangung des Grades eines
D O C T O R O F P H I L O S O P H Y
-Ph.D.-

i m F a c h g e b i e t
P a r a s i t o l o g i e

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Christina Strube
aus Kassel

Hannover 2004

Supervisor: Prof. Dr. T. Schnieder

Betreuungsgruppe: Prof. Dr. T. Schnieder
Prof. Dr. P. Valentin-Weigand
Prof. Dr. K. Pfister

1. Gutachten: Prof. Dr. T. Schnieder
Institut für Parasitologie
Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. P. Valentin-Weigand
Institut für Mikrobiologie
Tierärztliche Hochschule Hannover
Prof. Dr. K. Pfister
Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
Tierärztliche Fakultät
Ludwig-Maximilians-Universität München

2. Gutachten: Prof. Dr. H. Zahner
Institut für Parasitologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2004

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Karl-Enigk-Stiftung

Im Gedenken an F.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt:

Christina Strube, Georg von Samson-Himmelstjerna, Thomas Schnieder (2002)

„Molecular studies of the genetic regulation of hypobiosis in *Dictyocaulus viviparus*“

Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology (DGP and NVP)

Lübeck-Travemünde, 20.-23.03.2002

Christina Strube, Georg von Samson-Himmelstjerna, Thomas Schnieder (2002)

„Gene expression in hypobiosis induced and not induced *Dictyocaulus viviparus* larvae“

XXII World Buiatric Congress

Hannover, 18.-23.08.2002

Christina Strube, Georg von Samson-Himmelstjerna, Thomas Schnieder (2003)

„Untersuchungen zur Genregulation der Entwicklungshemmung bei Larven des Rinderlungenwurms *Dictyocaulus viviparus*“

Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“

Leipzig, 20.-21.03.2003

Christina Strube, Georg von Samson-Himmelstjerna, Thomas Schnieder (2003)

„Genes involved in hypobiosis in bovine lungworm“

World Association for the Advancement of Veterinary Parasitologie (WAAVP)

New Orleans, 10.-14.08.2003

Christina Strube, Georg von Samson-Himmelstjerna, Thomas Schnieder (2004)

"Investigation of differentially transcribed genes in hypobiosis induced and not induced third-stage *Dictyocaulus viviparus* larvae by quantitative real-time PCR"

21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)

Würzburg, 17.-20.03.2004

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

Der große Lungenwurm *Dictyocaulus viviparus* ist neben *Ostertagia ostertagi* und *Cooperia oncophora* weltweit in den gemäßigten Klimazonen der wirtschaftlich bedeutsamste Parasit der Rinder. Die durch diesen Nematoden verursachte Erkrankung, die parasitäre Bronchitis, geht mit Entwicklungsstörungen und häufig sogar dem Tod infizierter Tiere einher. Insbesondere in endemischen Gebieten erleiden landwirtschaftliche Betriebe erhebliche Produktionseinbußen, da trotz vielfältiger Bekämpfungsmöglichkeiten Verluste nicht immer vermieden werden können.

Die Fähigkeit des Parasiten, seine Entwicklung im Wirt zu unterbrechen, wenn für die frei lebenden, wenig resistenten larvalen Stadien lebensfeindliche Umweltbedingungen herrschen, ist von großer epidemiologischer Bedeutsamkeit. Während dieser Zeit, nämlich den Wintermonaten auf der nördlichen Halbkugel, persistieren die entwicklungsgehemmten, präadulten Stadien in der Lunge, ohne dass die betroffenen Tiere klinische Symptome zeigen oder Larven ausscheiden. Nach der Weiterentwicklung zu adulten, sich reproduzierenden Parasiten scheiden die infizierten Tiere im Frühjahr wiederum ohne sichtbare Krankheitsanzeichen Larven aus, kontaminieren die Weideflächen und stellen somit eine enorme Gefahr für empfängliche Jungtiere dar. Diese unerkannten Ausscheider, bei welchen es sich in erster Linie um ältere Rinder handelt, gelten als Hauptverbreitungsquelle der Lungenwurminfektion.

Die einzelnen Stadien der Entwicklung eines Organismus sowie der damit verbundene Zellstoffwechsel werden durch Aktivierung bzw. Reprimierung bestimmter Gene gesteuert, wobei exo- oder endogene Faktoren modulierend wirken können. Daher ist davon auszugehen, dass auch die Hypobiose nach Induktion durch Umweltfaktoren einer genetischen Regulation unterliegt. Bislang sind jedoch bei *D. viviparus* und anderen parasitischen Nematoden keine in die Entwicklungshemmung involvierten Gene bekannt. Molekulargenetisch erfolgt die Identifizierung aktivierter Gene oftmals auf der Ebene der messenger RNA, welche Transkripte von Genen darstellt und in die entsprechenden Proteine translatiert wird. Der Vergleich von RNA-Populationen, welche unterschiedliche Zustände eines Organismus repräsentieren, ermöglicht die Erfassung solcher Transkripte, die für einen bestimmten Zustand spezifisch sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch den Vergleich der Gentranskription Hypobiose induzierter und nicht induzierter dritter Lungenwurmlarven solche Gene zu identifizieren, die im Zuge der Entwicklungsinhibition aktiviert oder reprimiert werden. Außerdem soll eine nähere Charakterisierung dieser Gene erfolgen. Zusätzlich soll untersucht werden, ob Homologe von Genen, die den Prozess der Entwicklungshemmung des frei lebenden Erdnematoden *Caenorhabditis elegans* steuern, auch bei *D. viviparus* vorhanden sind. Dadurch soll die genetische Regulation der Hypobiose beim großen Lungenwurm des Rindes ansatzweise aufgeklärt werden.

2 Schrifttum

2.1 Die Diktyokaulose des Rindes

2.1.1 Der Erreger

Bei *Dictyocaulus viviparus* (BLOCH 1782), dem großen Lungenwurm des Rindes, handelt es sich um einen Nematoden, welcher taxonomisch der Ordnung der *Strongylida* und der Familie der *Dictyocaulidae* angehört. Er verursacht die parasitäre Bronchitis. Der adulte, sich reproduzierende Parasit siedelt sich in den Bronchioli, Bronchien sowie der Trachea von Rindern und verschiedenen Wildwiederkäuerarten an (ENIGK u. HILDEBRANDT 1969; PRESIDENTE et al. 1972; PRESIDENTE u. KNAPP 1973).

Als weitere Arten der Gattung *Dictyocaulus* parasitieren bei Equiden *D. arnfieldi*, bei kleinen Wiederkäuern *D. filaria* und bei Reh und Rotwild *D. eckerti* (SKRJABIN 1931; GOTHE 1983; GOTHE u. KANDELS 1984). Dass es sich bei letztgenanntem um eine eigene Spezies und nicht um ein *D. viviparus*-Isolat handelt, haben molekulargenetische Untersuchungen ergeben (EPE et al. 1995; SCHNIEDER et al. 1996a; EPE et al. 1997). Nach GIBBONS u. KHALIL (1988) existieren als weitere Arten *D. cameli* und *D. africanus* bei afrikanischen Paarhufern. Kürzlich beschrieben GIBBONS u. HØGLUND (2002) mit *D. capreolus* eine neue Spezies bei Rothirschen und Elchen in Schweden, auf deren Eigenständigkeit bereits vorangegangene Untersuchungen hindeuteten (HØGLUND et al. 1999). Arten, die bei mehreren Wirtstierarten auftreten, zeigen eine unterschiedliche Anpassung an ihre Wirte, welche sich unter anderem durch die Ausbildung einer patenten Infektion äußert. Diese erfolgt bezüglich *D. arnfieldi* erheblich häufiger im Esel als im Pferd (HASSLINGER 1989), für *D. viviparus* ist das Rind empfänglicher als die Wildwiederkäuer (KUTZER 1988; BIENIOSCHEK 1994).

2.1.2 Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung

D. viviparus ist weltweit in Gebieten gemäßigten Klimas verbreitet, in denen zumindest zeitweise Temperaturen zwischen 15 °C und 20 °C herrschen (SCHNIEDER 2000). Nach serolo-

gischer Untersuchung von 258 niedersächsischen Herden erstsömmriger Rinder konnten SCHNIEDER et al. (1993) eine Seroprävalenz von knapp 40 % feststellen. In Schleswig-Holstein wurden im Rahmen einer parasitologischen Sektion bei gut 73 % der insgesamt 15 Jungbullen Lungenwürmer nachgewiesen (REHBEIN et al. 2003). Niederländische Untersuchungen ergaben, dass mehr als 75 % der 123 untersuchten Herden seropositiv reagierten (BOON et al. 1986). In England traf dies auf 66 % von insgesamt 32 Rinderherden (BAIN u. SYMINGTON 1986), in Schweden auf 80 % der 15 untersuchten Betriebe zu (HØGLUND et al. 2001).

In endemischen Gebieten erlangt die Diktyokaulose große wirtschaftliche Bedeutung, da sie hier zur wichtigsten Mortalitätsursache bei Weiderindern werden kann (JARRETT et al. 1954). Aber auch in Gebieten mit geringerer Inzidenz ergeben sich für landwirtschaftliche Betriebe erhebliche Produktionseinbußen durch unerwartete und zunächst unerkannte Ausbrüche der Diktyokaulose (JØRGENSEN u. OGBOURNE 1985). Im Jahr 1993 registrierten die Veterinäruntersuchungsämter in England und Wales 135 Fälle parasitärer Bronchitis mit einer Morbidität von 10 % bis 100 % und einer Mortalität von 3 %. Dabei waren Kälber entgegen der Erwartungen nur in 28 % der Fälle betroffen (DAVID 1993).

2.1.3 Biologie und Entwicklungszyklus

Mit dem Kot des infizierten Wirtes werden unbescheidete erste Lungenwurmlarven ausgeschieden (TAYLOR 1951; SOLIMAN 1953; JØRGENSEN 1980). Diese entwickeln sich unter günstigen klimatischen Bedingungen innerhalb einer Woche über ein zweites, einfach bescheidetes Larvenstadium zu den 300 µm bis 400 µm langen dritten, doppelt bescheideten, infektiösen Larven (BACINSKY 1973). Während dieser Entwicklungszeit nehmen die Larven keine Nahrung auf, sondern zehren von ihren in Granula gespeicherten Reservestoffen (PFEIFFER u. SUPPERER 1980; OAKLEY 1983). Da Rinder das Grasen in unmittelbarer Nähe von Kothaufen vermeiden, ist zur Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens eine Translokation der Larven notwendig. Passiv geschieht die Verbreitung der Larven durch eine Verteilung der Kotfladen, eine aktive Verbreitung erfolgt durch Vektoren wie Käfer, Vögel oder koprophile Pilzen der Gattung *Pilobolus* (JØRGENSEN et al. 1982). Erst nach Passage

des Herbivorendarms keimen diese Pilze aus, in deren Sporangien sich die *D. viviparus*-Larven von basal einbohren, um bei Licht und steigender Temperatur mit diesen Fruchtkörpern mehrere Dezimeter vom Kothaufen weggeschleudert zu werden (DONCASTER 1981).

Nach oraler Aufnahme werden die Lungenwurmlarven durch Kontakt mit der Gallenflüssigkeit des Wirtes aktiviert (JØRGENSEN 1973). Nach Verlust ihrer Scheiden durchdringen sie die Dünndarmschleimhaut und gelangen über das Lymphgefäßsystem zu den Mesenteriallymphknoten, wo die Häutung zur vierten Larve erfolgt (JARRETT et al. 1957). Diese erreicht über den *Ductus thoracicus* sowie die *Vena cava cranialis* die rechte Herzkammer, von wo aus der weitere Weg über die *Arteria pulmonalis* zum Kapillargebiet der Lunge erfolgt. Hier bohren sich die Larven in die Alveolen aus, häuten sich zu geschlechtlich differenzierten, präadulten fünften Stadien und erreichen ungefähr eine Woche *post infectionem* (*p.i.*) die Bronchioli und Bronchien. Es folgt eine intensive Wachstumsphase, so dass drei bis vier Wochen *p.i.* erste geschlechtsreife Lungenwürmer vorliegen, wobei männliche Adulte 3 bis 4 cm, weibliche 3 bis 8 cm lang sind (BACINSKY 1973). Die Präpatenz beträgt somit drei bis vier Wochen, die Patenz dauert etwa einen Monat (JØRGENSEN u. OGBOURNE 1985).

Die bereits embryoniert abgelegten Eier gelangen über das Flimmerepithel der Trachea in den Pharynx und werden vom Wirtstier abgeschluckt, ein geringer Teil wird auch mit dem Sputum ausgehustet. Während der Magen-Darm-Passage schlüpfen die ersten Larven und gelangen mit dem Kot in die Außenwelt. Herrschen hier Temperaturen unter 8 °C, setzt nach Aufnahme durch den Wirt eine Entwicklungshemmung im frühen präadulten Stadium ein (BARTH u. PRESTON 1987).

Bezüglich der Hypobiose sei an dieser Stelle auf die weiteren Ausführungen im Kapitel 2.2 verwiesen.

2.1.4 Klinik und Pathogenese

Der Krankheitsverlauf der Diktyokaulose kann nach URQUHART et al. (1973) in vier Phasen mit eigenständiger Symptomatik untergliedert werden.

Die Penetrationsphase, welche in der ersten Woche *p.i.* vonstatten geht, umfasst die orale Aufnahme der Larven bis zu deren Anwesenheit in der Lunge. Infolge der durch die Penetration der Larven verursachten Läsionen der Darmschleimhaut entsteht eine subklinische Enteritis. Klinisch kann lediglich ein leichter Hustenreiz beobachtet werden (PFEIFFER 1971).

In der vom 8. bis 21. Tag *p.i.* dauernden alveolär-bronchialen Phase, welche zusammen mit der Phase der Penetration die Präpatenzzeit darstellt, verursachen die in den Bronchien und Bronchioli vorhandenen präadulten Stadien eine Entzündung dieser luftführenden Wege. Der Schweregrad dieser Bronchitis hängt von der Anzahl initial aufgenommener infektiöser Larven, Alter sowie Ernährungszustand des Wirtstieres und den vorherrschenden Witterungsbedingungen ab (URQUHART et al. 1973). Zu Beginn der zweiten Woche *p.i.* steigt nach JARRETT et al. (1957) die Atemfrequenz der Tiere, teilweise kann auch Husten festgestellt werden. In Abhängigkeit von prädisponierenden Faktoren klingen diese Symptome ab oder verstärken sich. Im letzteren Fall steigt die Atemfrequenz auf 70 Atemzüge pro Minute, häufiges Husten und Dyspnoe sind zu beobachten. Je nach Schwere der Erkrankung kommt es zu einer Verminderung oder gar Zerstörung des Zilienbesatzes der Bronchialepithelien, was eine Verminderung der mukoziliären Clearance bedingt. Ansammlungen von vermehrt gebildetem Schleim, Zelltrümmern und Entzündungszellen obstruieren die Bronchiolen, nachfolgende Alveolen werden atelektatisch. Das Bronchialepithel wird durch hyperplastische Basalzellen, das flache Alveolarepithel durch Typ II-Pneumozyten ersetzt (SCHNIEDER et al. 1991). Pathohistologisch ist weiterhin eine lokale Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen feststellbar (SCHNIEDER et al. 1991; COLLIE et al. 2001).

Im Laufe der Patenzphase schreiten die Krankheitserscheinungen weiter voran. Betroffene Tiere zeigen Inappetenz, Fieber und mukösen Nasenausfluss. Die erschwerte Atmung bedingt eine sägebockartige Stellung der Tiere. Auf Grund der schlechten Abwehrlage der erkrankten Rinder kommt es häufig zu bakteriellen Superinfektionen mit der Folge einer katarrhalisch-purulenten Bronchopneumonie (MICHEL u. SHAND 1955; JARRETT et al. 1957; PFEIFFER u. SUPPERER 1980). Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten wandern in die Alveolen und Bronchiolen ein (SCHNIEDER et al. 1991), um die Entzündungsursache zu eliminieren.

In der Phase der Postpatenz erholen sich die betroffenen Tiere. Der größte Teil der Lungenwurmpopulation ist eliminiert und die Krankheitssymptome klingen ab. Infolge gesteigerter Futteraufnahme kehren die Tiere zu ihrem Ausgangskörpergewicht zurück (JARRETT et al. 1957; URQUHART et al. 1973; OAKLEY 1983; SCHNIEDER et al. 1996b). In einigen Fällen ist der Krankheitsverlauf jedoch so gravierend, dass sich die klinischen Symptome verschlechtern und die Tiere nach zwei bis vier Tagen sterben.

Werden Kühe auf stark kontaminierte Weiden getrieben und sind somit plötzlich einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt, kann das so genannte Reinfektionssyndrom beobachtet werden. Auf Grund unzureichender Immunität gelangen etliche Larven in die Lunge, so dass eine akute und schwere Erkrankung resultiert.

2.1.5 Diagnose

Leichte respiratorische Symptome sechs bis acht Wochen nach Weideaustrieb der Tiere geben erste Hinweise auf einen Lungenwurmbefall. Unter körperlicher Belastung ist Husten induzierbar (PFEIFFER u. SUPPERER 1980; GRÄFNER 1987). In der Initialphase der Erkrankung sind die klinischen Symptome jedoch nicht pathognomonisch (TAYLOR 1951; JARRETT et al. 1957; SCHNIEDER et al. 1989), daher sollten sich geeignete Nachweisverfahren anschließen.

Das Trichter-Auswanderverfahren nach BAERMANN (1917) dient dem direkten und spezifischen Erregernachweis. Laut SCHNIEDER u. BELLMER (1993) wurde diese Technik in 258 niedersächsischen Betrieben jedoch nur in 2,7 % der Fälle zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose angewandt. Mit Hilfe dieser Methode ist, wie auch beim Nachweis von Eiern und Larven im Sputum infizierter Tiere (BOON et al. 1984), der direkte Erregernachweis frühestens drei Wochen *p.i.* möglich (JARRETT et al. 1958; DÜWEL 1971; BOS u. BEEKMAN 1985). Für eine sichere Herdendiagnose sind bei negativem Untersuchungsbefund Probennahmen von mehreren Tieren an aufeinander folgenden Tagen notwendig (PFEIFFER u. SUPPERER 1980), da die Parasitenausscheidung der Wirtstiere intervallweise und quantitativ unterschiedlich erfolgt (TAYLOR 1951; JARRETT et al. 1958; DÜWEL 1971).

Serologische Nachweisverfahren stellen eine weitere Möglichkeit zur Diagnose einer Lungenwurminfektion dar. Der Infektionsnachweis durch stark ansteigende Titer komplementbindender Antikörper wurde erstmals von JARRETT et al. (1955a) beschrieben. Dieser Antikörperanstieg kann erstmalig vier bis sechs Wochen *p.i.* unter Verwendung von aus adulten Parasiten gewonnenem Antigen verzeichnet werden (JARRETT et al. 1959; CORNWELL 1960). Auch der Agargelpräzipitationstest erlaubt nur den Nachweis einer patenten Infektion (PARFITT u. SINCLAIR 1967; SWIETLIKOWSKI 1969). Der indirekte Hämagglutinationstest eignet sich zum Antikörpernachweis sowohl nach einer Infektion als auch einer Vakzination (BOKHOUT et al. 1979). Zwar beobachteten DE LEEUW u. CORNELISSEN (1991) Kreuzreaktionen mit Seren von Tieren, die mit *Fasciola hepatica* und *Ascaris suum* monoinfiziert waren, die Titer waren jedoch sehr gering.

MARIUS et al. (1979) stellten den ersten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für *D. viviparus* vor. Bei Verwendung von aus adulten Lungenwürmern gewonnenem Rohantigen erwies sich dieser Test als sehr sensitiv, wobei der initiale Titeranstieg frühestens drei (BOON et al. 1982) bis vier (MARIUS et al. 1979) Wochen *p.i.* registrierbar ist. Zwei Wochen *p.i.*, also noch während der Präpatenz, konnten BOS u. BEEKMAN (1985) unter Verwendung somatischen Antigens aus dritten sowie *in vitro* kultivierten vierten Larven einen signifikanten Titeranstieg feststellen.

SCHNIEDER (1992, 1993b) beschrieb den Einsatz eines rekombinanten Antigens zur Diagnose der Diktyokaulose des Rindes. Als Gluthation-S-Transferase Fusionsprotein ergab das DvGST3-14 Antigen im indirekten ELISA bei Untersuchung von Seren experimentell infizierter Kälber eine 93 %ige Sensitivität bei 99 %iger Spezifität. Da es sich bei dem Antigen um ein spezifisches Protein adulter Lungenwürmer handelt, reagieren Seren vakzinierter Tiere nicht positiv (SCHNIEDER 1993b). Dieses rekombinante Antigen diente der Entwicklung eines diagnostischen Dipstick Immunoassays, welcher eine hohe Spezifität und Sensitivität besitzt und ohne aufwendigen personellen und apparativen Aufwand angewendet werden kann (SCHNIEDER 1993a).

2.1.6 Bekämpfung

Die Bekämpfung der Diktyokaulose erfolgt durch weidetechnische Maßnahmen, strategischen Einsatz von Anthelminthika und Vakzinierung (ROMMEL u. SCHNIEDER 1989). Das Ziel besteht in der Vermeidung wirtschaftlicher Verluste durch eine Unterbindung der Infektion oder, falls dies nicht möglich sein sollte, der Begrenzung auf ein subklinisches Niveau (BÜRGER 1983; BÜRGER 1987). In enzootischen Gebieten wird die Induktion einer protektive Immunität erstsömmriger Rinder ohne Erkrankung derselben angestrebt (MICHEL u. SHAND 1955).

2.1.6.1 Weidetechnische Maßnahmen

In Gebieten mit geringer Inzidenz kann zur Vermeidung der Infektion der Versuch unternommen werden, empfängliche Rinder auf lungenwurmfreie Weiden auszutreiben (POUPLARD 1968; GUPTA u. GIBBS 1970; MICHEL 1976; PFEIFFER u. SUPPERER 1980). Eine gemeinsame Beweidung erstsömmriger und zweitsömmriger Tiere sollte vermieden werden, da letztere als unerkannte Ausscheider fungieren können (JARRETT et al. 1955b; PFEIFFER u. SUPPERER 1980; OAKLEY 1983). Auch sollten erstsömmrige Rinder auf eine zuvor von älteren Tieren genutzte Fläche erst nach Ablauf von fünf Wochen bis vier Monaten (MICHEL u. SHAND 1955; POUPLARD 1968) oder gar erst nach einem Jahr (PFEIFFER u. SUPPERER 1980) ausgetrieben werden. SELMAN (1984) hingegen vertritt die Ansicht, dass bei gemeinsamer Weidenutzung von älteren immunen und empfänglichen Tieren letztere infolge der Aufnahme weniger Larven eine protektive Immunität erlangen. In gefährdeten Gebieten kann ein ständiger Umtrieb im Abstand von drei bis acht Tagen einer massiven Infektion vorbeugen, da die *D. viviparus*-Larven mindestens vier Tage benötigen, um Infektiösität zu erlangen (HIEPE 1985; EYSKER et al. 1992). Jungrinder sollten auf möglichst trockenen Flächen gehalten und über künstliche Tränken versorgt werden, da zur Entwicklung, Verbreitung und Überleben infektionsfähiger Larven Feuchtigkeit eine wichtige Rolle spielt (TAYLOR 1951; ENIGK u. DÜWEL 1962; PFEIFFER u. SUPPERER 1980). Die Besatzdichte der Weideflächen ist insofern von Bedeutung, als dass bei intensiver Beweidung die Tiere genötigt sind, auch in unmittelbarer Umgebung von Kothaufen zu grasen (E-

NIGK u. DÜWEL 1962; BOON et al. 1986). Somit erklärt sich der von BELLMER (1990) festgestellte geringere Lungenwurmbefall bei Tieren, die auf der Weide zugefüttert wurden. Des Weiteren mindern ein später Austrieb sowie frühes Aufstallen die Gefahr einer Lungenwurminfektion (BOON et al. 1986; BELLMER 1990; KOHLER-BELLMER 1991).

2.1.6.2 Anthelminthika

Verschiedene Breitbandanthelminthika können zur Behandlung und Bekämpfung der Diktyokaulose eingesetzt werden, wobei an dieser Stelle auf die Arbeit von KOHLER-BELLMER (1991) verwiesen werden soll.

Die größte Bedeutung bei der Lungenwurmbekämpfung kommt heutzutage den makrozyklischen Laktonen wie Ivermectin, Doramectin, Eprinomectin und Moxidectin zu, welche eine schlaffe Paralyse des Parasiten bedingen (UNGEMACH 1994). Diese Substanzen bewirken eine mindestens 99 %ige Reduktion der Wurmbürde und zeichnen sich zudem durch eine sehr gute Langzeitwirkung aus (GOUDIE et al. 1993; JONES et al. 1993; WEATHERLEY et al. 1993; YAZWINSKI et al. 1994; WHELAN et al. 1995; HUBERT et al. 1995; SCHNIEDER et al. 1996c; HUBERT et al. 1997; STROMBERG et al. 1999; EPE et al. 1999; CRAMER et al. 2000).

Das zyklische Depsipeptid PF 1022A ist ein Vertreter einer neuen Stoffklasse mit antiparasitärer Wirkung und stellt ein Fermentationsprodukt des Pilzes *Mycelia sterilia* dar (SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. 2000). Die Autoren konnten bereits drei Tage nach Gabe von 1 mg/kg PF 1022A intravenös respektive 5 mg/kg per os eine Reduktion der Lungenwurmlarven von über 99 % feststellen.

Hypobiotische Parasitenstadien weisen eine herabgesetzte Stoffwechselrate auf und sind daher in der Lage, lange Perioden zu überdauern (ARMOUR u. BRUCE 1974; EYSKER 1993). Diese geringere metabolische Aktivität wird mit einer verminderten Suszeptibilität gegenüber Anthelminthika in Verbindung gebracht (ANDERSON et al. 1965a; MICHEL 1967; ANDERSON 1977). Untersuchungen von WILLIAMS et al. (1997) bestätigen dies für Oxfendazol und Fenbendazol. Während die Wirksamkeit dieser Benzimidazole gegen adulte Stadien

von *O. ostertagi* knapp 79 % bzw. 64 % betrug, konnten die Autoren bei inhibierten vierten Stadien nur eine 32 %ige respektive 40 %ige Wirksamkeit feststellen. Bei der Applikation von Albendazol und Ivermectin Pour-on hingegen ergaben sich keine Differenzen bezüglich der Wirksamkeit. Ebenso konnten BARTH u. PRESTON (1987) in den Lungen Ivermectin-behandelter Tiere keine inhibierten Lungenwurmstadien auffinden. In der nicht behandelten Tiergruppe bestand die Parasitenpopulation hingegen zu über 99 % aus gehemmten fünften Stadien. Nach Verabreichung von Levamisol ergab sich für inhibierte und adulte Stadien von *H. contortus* und *O. ostertagi* eine annähernd gleiche Reduktion von mindestens 96,9 % (ANDREWS 2000). Eine interessante Entdeckung bezüglich der Wirksamkeit von Benzimidazolen machten MILLER u. OLSON (1990) in Louisiana. Sie beobachteten eine bessere Effektivität gegen hypobiotische *O. ostertagi*-Larven im Frühjahr und Herbst im Gegensatz zum Sommer, der Mitte der Inhibitionsperiode. EYSKER (1997) vermutet diesbezüglich einen tieferen „Schlaf“ der gehemmten Stadien in der Mitte als zu Beginn oder Ende der Inhibitionsperiode. Eine Reaktivierung inhibierter Larven nach dem Einsatz von Anthelminthika, wie sie beispielsweise als Pathomechanismus bei der larvalen Cyathosthominose des Pferdes diskutiert wird, konnte zumindest für Fenbendazol und Moxidectin nicht bestätigt werden (BAUER et al. 2003).

In England und Wales wurden 1993 vermehrt Diktyokauloseausbrüche verzeichnet, wobei eine hohe Zahl erkrankter älterer Tieren registriert wurde (DAVID 1993). Auch PLOEGER (2002) stellt einen Wechsel von Kälbern hin zu erwachsenen Tieren bezüglich der Inzidenz der Ausbrüche fest, was mehrere Autoren mit einer unzureichenden Immunisierung erstsömmriger Kälber in Zusammenhang bringen. Die sehr gute Wirksamkeit verschiedener Präparate in Verbindung mit deren strategischen Einsatz verhindert insbesondere in Gebieten mit geringem Infektionsdruck eine gewisse Weidekontamination, wie sie zur Entwicklung einer protektiven Immunität nötig wäre (CONNAN 1993; DAVID 1993; OAKLEY 1993). SCHNIEDER et al. (1996c) untersuchten in einer Zweijahresstudie vergleichend die Immunitätsbildung von erstsömmrigen, mit einem Ivermectin-Bolus behandelten Kälbern im Gegensatz zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. In der zweiten Weideperiode waren die unbehandelten Tiere besser gegen eine klinische Diktyokaulose geschützt, was durch stärkere Gewichtszunahmen und geringere Larvenausscheidung im Vergleich zu den im Vorjahr behandelten Tieren offensichtlich wurde.

2.1.6.3 Vakzinierung

PFEIFFER u. SUPPERER (1980) empfehlen vor allem in endemischen Gebieten die Impfung erstsömmriger Kälber und auch älterer Tiere, wenn diese längere Zeit keinen Lungenwurmkontakt hatten. Das Impfvorhaben sollte dabei immer alle gemeinsam weidenden Rinder einbeziehen (DÜWEL 1971; OAKLEY 1983). Dabei werden den Tieren zweimal im Abstand von vier bis sechs Wochen 1000 mit 400 Gray bestrahlte, infektiöse Larven oral verabreicht. Hierdurch ist ein Schutz vor Erkrankung auch bei starken Infektionen gegeben (JARRETT et al. 1957). Bei massiven Reinfektionen, in Einzelfällen auch ohne Reinfektion, kommt es jedoch zur Heranreifung adulter Lungenwürmer sowie zur Larvenausscheidung (MICHEL et al. 1965; DÜWEL 1971; PFEIFFER u. SUPPERER 1980). Die sich daraus ergebende Weidekontamination führt zur Superinfektion und dadurch zu einer fortwährenden Auffrischung der Impfung (ECKERT 1972; URQUHART 1985). Dies ist infolge der nur drei bis fünf Monate anhaltenden Impfimmunität (MICHEL et al. 1965) auch notwendig. Da das Alter der Impflinge Einfluss auf die Belastbarkeit der Immunität nimmt, empfiehlt DÜWEL (1971) eine Vakzinierung erst ab einem Alter von zwei Monaten. Anschließend sollten die Tiere zudem noch zwei bis vier Monate aufgestallt bleiben.

2.1.6.4 Biologische Bekämpfung

Der nematophage Pilz *Duddingtonia flagrans*, welcher aus dem Kot von Rindern isoliert werden konnte, bietet nach LARSEN (1999) neue Möglichkeiten zur Prophylaxe. Dieser Pilz immobilisiert und zerstört frei lebende Larven in einem Hyphennetz. HENRIKSEN et al. (1997) stellten in Rinderkot nach Zusatz von 50 000 Chlamydosporen/g Kot durchschnittlich eine 86 %ige Reduktion der Anzahl an *D. viviparus*-Larven fest. Würde dieser Pilz als Futtersupplement oder in Form von Lecksteinen eingesetzt, könnte die Anzahl infektiöser Larven auf der Weide reduziert und somit klinische oder subklinische Erkrankungen vermieden werden (LARSEN 1999). Inwieweit die biologische Bekämpfung der Diktyokaulose mit *D. flagrans* Praxisreife erlangt, bleibt abzuwarten.

2.2 Hypobiose

Das Phänomen der Entwicklungshemmung oder inhibierten Entwicklung, welches auch als Hypobiose oder Diapause bezeichnet wird, ist bei verschiedensten Organismen beschrieben. An dieser Stelle soll im Wesentlichen nur auf die zur Hypobiose befähigten parasitischen Nematoden der Wiederkäuer eingegangen werden.

Da in einer Parasitenpopulation meist nur eine gewisse Anzahl der Nematoden und zudem nur bei bestimmten auslösenden Faktoren hypobiotisch wird, stellt die Entwicklungshemmung ein fakultatives Phänomen dar (EYSKER 1993). Das Larvenstadium, in welchem die Entwicklungshemmung einsetzt und damit auch der Ansiedlungsort der hypobiotischen Stadien im Wirtsorganismus variiert familien- und gattungsabhängig. Während der Inhibition persistieren die Entwicklungsstadien im Wirtsorganismus, ohne durch Immunmechanismen eliminiert zu werden. So verbleiben gehemmte Lungenwurmstadien über Monate ohne erkennbare Zellinfiltration in den Bronchien, wohingegen ungehemmte Stadien in der Lunge betroffener Tiere eine starke zelluläre Reaktion mit Infiltration eosinophiler und neutrophiler Granulozyten sowie die Bildung von Fremdkörperriesenzellen auslösen (SCHNIEDER et al. 1991). Nach MITCHELL (1982) existieren bei Parasiten drei Immunevasionsstrategien: eine reduzierte oder veränderte Antigenität respektive Immunogenität, Modifikationen in der Induktion und Stärke der Immunantwort sowie intrazelluläre Veränderungen der Makrophagen. So ergab sich eine herabgesetzte antigene Potenz bei für zwei Monate bei 4 °C gekühlten *H. contortus*-Larven, deren Antigen in Komplementbindungsreaktionen eingesetzt wurde (THOMAS et al. 1975). Bei vergleichenden Labmagenuntersuchungen von Rindern, welche mit einem zur Hypobiose befähigten respektive nicht befähigten *O. ostertagi*-Stamm infiziert waren, konnten jedoch bei ersteren stärkere zelluläre Reaktionen der Mukosa festgestellt werden. Auch war die Anzahl IgG- und IgM-, jedoch nicht IgA-produzierender Zellen, erhöht (SMEAL 1982).

2.2.1 Funktion der Hypobiose

Grundsätzlich kann nach GIBBS (1986) bei parasitischen Nematoden auf Grund verschiedener auslösender Mechanismen zwischen zwei Typen der Hypobiose unterschieden werden, nämlich der durch Immunmechanismen ausgelösten und wirtsunabhängigen Entwicklungs-

hemmung, wobei letztere vorrangig eine saisonale Anpassung darstellt. Ähnlich unterteilt HORAK (1981) in eine unspezifische Entwicklungshemmung, die zu jeder Zeit durch wirts- oder parasitenspezifische Faktoren ausgelöst werden kann, sowie einer jährlich stattfindenden saisonalen Entwicklungshemmung, welche immer in derselben Jahreszeit auftritt. Die Hypobiose stellt eine wichtige Überlebensstrategie der Parasiten dar (BLITZ u. GIBBS 1972a), da sie den Parasiten das Überdauern für sie ungünstiger Umweltbedingungen ermöglicht, um anschließend die Entwicklung fortzusetzen, sich zu reproduzieren und somit eine Verbreitung der Population von Jahr zu Jahr sicherzustellen (GIBBS 1986; DAME et al. 1993; EYSKER 1993; KOOYMAN u. EYSKER 1995). GIBBS (1982) vermutet in der Hypobiose weiterhin die Strategie der Parasiten, sich möglichst früh und in großer Zahl in neugeborenen Tieren anzusiedeln. Geschieht dies früh genug, könnte dies eine Immuntoleranz des Wirtes bedingen. Dahingegen hätte die Aufnahme sehr vieler infektiöser Larven möglicherweise eine Immunparalyse des Neonaten zur Folge.

EYSKER et al. (1994) stellten fest, dass vor allem ältere Rinder inapperent mit inhibierten Lungenwurmstadien infiziert sind. Reifen diese zu adulten, sich reproduzierenden Parasiten, erfolgt die Larvenausscheidung ohne klinische Symptome. Diese unerkannten Ausscheider kontaminieren die Weideflächen und stellen eine enorme Gefährdung empfänglicher Jungtiere dar. Die Entwicklungshemmung, in deren Folge infizierte Tiere als Carrier fungieren, spielt somit eine bedeutsame Rolle in der Epidemiologie parasitischer Nematoden (EYSKER 1993; EYSKER et al. 1994; KOOYMAN u. EYSKER 1995).

2.2.2 Morphologie inhibierter *D. viviparus*-Larven

Inhibierte Parasitenpopulationen können durch ihr uniformes Aussehen identifiziert werden. Da sich in natürlichen Populationen normalerweise auch ein Teil der Larven ungehemmt entwickelt, ergibt sich eine bimodale Größenverteilung (EYSKER 1993). INDERBITZIN (1976) und PFEIFFER (1976) fanden nach experimenteller Infektion mit gekühlten *D. viviparus*-Larven in den Lungen der Tiere inhibierte präadulte fünfte Stadien. Beide Autoren werteten dabei Stadien mit einer Länge von weniger als 5 mm bei Vorhandensein einer Genitalanlage als entwicklungsgehemmt. GUPTA u. GIBBS (1976) beschreiben hypobiotische Lungen-

wurmlarven mit einer Länge von 0,9 bis 2,7 mm und einem Genitalsystem, welches bei allen Larven in ähnlichem Ausmaß entwickelt war. Neuere Untersuchungen zur Morphologie führten SAMSON-HIMMELSTJERNA u. SCHNIEDER (1999) an inhibierten Larven aus Lungenspülproben zweier experimentell infizierter Kälbern durch. Es zeigte sich, dass, wie auch für *O. ostertagi* (ARMOUR et al. 1969) und *H. contortus* (BLITZ u. GIBBS 1972a) beschrieben, die Entwicklungshemmung bereits in den vierten Lungenwurmstadien einzusetzen scheint. Bei allen aus den Spülproben am 15. bzw. 68. Tag *p.i* isolierten entwicklungsgehemmten *D. viviparus*-Larven konnten SAMSON-HIMMELSTJERNA u. SCHNIEDER (1999) Genitalanlagen feststellen. Die am 15. Tag *p.i.* gewonnen vierten Larven (L4) waren dabei zwischen 0,8 mm und 1,08 mm lang. Zwischen 8,62 mm und 10,85 mm variierte die Länge der 68. Tag *p.i.* isolierten Larven, welche zudem eine Scheide aufwiesen und daher als 4M Stadien klassifiziert wurden. Die Autoren folgern, dass in den Lungen befindliche hypobiotische Larven entweder kontinuierlich oder am Ende der Inhibitionsperiode ein Längenwachstum aufweisen und sich währenddessen vom Stadium der L4 zur 4M entwickeln.

2.2.3 Regulation der Hypobiose bei parasitischen Nematoden

Die genauen Mechanismen sowohl der Induktion als auch der Aufhebung der Entwicklungshemmung sind bei parasitischen Nematoden bislang nicht bekannt. Auf Grund verschiedener Untersuchungen konnten Faktoren ermittelt werden, die an der Induktion beteiligt sind. Über Faktoren, die zur Beendigung der Hypobiose beitragen, können bei den parasitischen Nematoden der Wiederkäuer lediglich Hypothesen aufgestellt werden. GIBBS (1968) und CONNAN (1978) bringen die Weiterentwicklung hypobiotischer Trichostrongyliden der Schafe in Zusammenhang mit der veränderten hormonellen Lage kurz vor der Geburt bis in die Laktationsphase, welche mit einer Immunsuppression einhergehen könnte. Vergleichende Untersuchungen an nicht lammenden und lammenden Mutterschafen konnten dies jedoch nicht bestätigen (SCHILLHORN van VEEN u. OGUNSUSI 1978). Auch blieben Versuche, inhibierte *O. ostertagi-* (PRICHARD et al. 1974) und *H. contortus*-Stadien (GIBBS 1968) durch Verabreichung von Immunsuppressiva an die Wirtstiere zu reaktivieren, erfolglos. Dahingegen ergaben Untersuchungen an *O. ostertagi* (BLITZ u. GIBBS 1972b) sowie *H. contortus* (ARMOUR u. BRUCE 1974), dass die Dauer der Inhibition unabhängig vom Immunstatus des

Wirtes als auch saisonalen Einflüssen ist, was auf eine prädeterminierte Länge der Hypobiose schließen lässt.

2.2.3.1 Klimatische Einflüsse

Die Entwicklungshemmung in parasitischen Nematoden setzt generell zu einer Zeit ein, in der die klimatischen Bedingungen für die Entwicklung oder das Überleben frei lebender Stadien ungünstig sind. Dies ist bei sehr kalter respektive sehr heißer oder trockener Witterung gegeben. EYSKER (1993, 1997) differenziert daher zwischen der Winter-Inhibition, welche im späten Herbst beginnt und der im Frühjahr oder vor der Trockensaison einsetzenden Sommer- oder Trockensaison-Inhibition und betrachtet die Witterungsbedingungen als den wohl wichtigsten Faktor bei der Induktion der Hypobiose.

Die Winter-Inhibition wird vor allem in Nord- sowie Zentraleuropa und Nordamerika beobachtet (GIBBS 1986; ARMOUR u. DUNCAN 1987). Der induzierende Faktor ist dabei in erster Linie die Temperatur, wobei andere, im folgenden noch zu diskutierende Faktoren, die Entwicklungshemmung positiv zu beeinflussen scheinen. Eine larvale Entwicklungshemmung kann bei *O. ostertagi* und *Teladorsagia circumcincta* experimentell durch mehrwöchige Kühlung bei 4 bis 6 °C induziert werden (CONNAN 1969; WRIGHT et al. 1973; ARMOUR u. BRUCE 1974; ARMOUR 1978; EYSKER 1981a). So wiesen Kälber, die mit acht Wochen bei 4 °C gekühlten *O. ostertagi*-Larven infiziert worden waren, durchschnittlich 66 % entwicklungsgehemmte Stadien auf (ARMOUR u. BRUCE 1974). Auch für *H. contortus* bestätigen Untersuchungen den Einfluss der Kühlung auf die Induktion der Hypobiose (BLITZ u. GIBBS 1972a). EYSKER (1981a) berichtet in diesem Zusammenhang, dass die stärkste Inhibition von *H. contortus*-Larven durch Inkubation bei 15-16 °C ausgelöst würde, niedrigere Temperaturen seien weniger effektiv. Auch bei *D. viviparus* ist die Induktion der Entwicklungshemmung durch mehrwöchige Kühlung bei 4-7 °C möglich (GUPTA u. GIBBS 1970; PFEIFFER 1976; INDERBITZIN 1976; PFEIFFER u. SUPPERER 1980; EYSKER et al. 1992; SAMSON-HIMMELSTJERNA u. SCHNIEDER 1999; RICKLING 1999). Nach sechswöchiger Inkubation infektiöser *D. viviparus*-Larven bei 4 °C konnten INDERBITZIN (1976) und PFEIFFER (1976) bereits 76 bis 94 % entwicklungsgehemmte Stadien, nach

achtwöchiger Kühlung sogar 97 bis 98 % solcher Stadien ausmachen. Es entwickelten sich jedoch ebenso 22 bis 49 % der nicht gekühlten Larven nur bis zum präadulten Stadium. Auch in Feldversuchen konnte der Einfluss niedriger Temperaturen auf die Induktion der Hypobiose beobachtet werden. So fanden ANDERSON et al. (1965b) bei Kälbern, die sich im späten Herbst nur zwei Wochen auf einer *O. ostertagi*-kontaminierten Weide befanden und solchen, die dort über die gesamte Weideperiode grasten, annähernd gleich hohe Prozentsätze von 87 bis 95 % an inhibierten Larven. Dahingegen waren bei Tieren, die im Frühherbst für vier Wochen auf diesen Flächen grasten, nur 8 bis 26 % der Parasitenpopulation hypobiotisch.

Die Sommer- oder Trockensaison-Inhibition kann bei *O. ostertagi* in den feuchten Regionen der Südhälfte Australiens (ANDERSON 1988), in Teilen von Argentinien, Uruguay und Brasilien (ENTROCASSO 1988), dem Süden der USA (WILLIAMS et al. 1983; WILLIAMS u. KNOX 1988) sowie Neuseeland (BISSET u. MARSHALL 1987) beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde des Weiteren bei *T. circumcincta, H. contortus, Oesophagostomum radiatum* und verschiedenen *Cooperia*-Arten der kleinen Wiederkäuer in verschiedenen afrikanischen und asiatischen Ländern, wie Gambia (N´DAO et al. 1995), Kenia (GATONGI et al. 1998), dem Senegal (VERCRUYSSE 1985), Nigeria (CHIEJINA et al. 1988) sowie dem Nordwesten Syriens (GIANGASPERO et al. 1992) beschrieben. Über die klimatischen Faktoren, die zur Auslösung dieser Form der Entwicklungshemmung beitragen, ist bislang wenig bekannt. FERNANDEZ et al. (1999) sehen in der Saison (Frühling) an sich einen wichtigen induzierenden Faktor. Sie stellten einen 3-15fach höheren Anteil hypobiotischer *O. ostertagi*-Larven in Kälbern fest, wenn diese im Frühjahr auf den Versuchsweiden grasten. Dieses Ergebnis konnte durch experimentelle Infektion mit Larven, die unter kontrollierten Licht- und Temperaturbedingungen im Labor inkubiert wurden, bestätigt werden. Unter solchen Bedingungen, die dem Frühling in der dortigen Region entsprachen, stieg der Prozentsatz hypobiotischer Larven von 3,6 % auf 94,9 %. Eine Temperaturerhöhung besaß dabei einen größeren Einfluss auf die Induktion der Entwicklungshemmung als verlängerte Helligkeitsphasen (FERNANDEZ et al. 1999). Durch Kühlung kann die Hypobiose bei zur Sommer-Inhibition befähigten bovinen Nematoden hingegen nicht induziert werden (SMEAL u. DONALD 1982b).

Ob die Tageslichtlänge auch die Induktion der Winter-Inhibition beeinflusst, ist fraglich (CONNAN 1975; GIBBS 1986). GIBBS (1973) zeigte, dass bei *H. contortus*-Larven, die einer Photoperiode von nur 10 Stunden im Gegensatz zu 16 Stunden ausgesetzt waren, der Anteil hypobiotischer Stadien signifikant höher war. Jedoch konnten CONNAN (1975) und CAPITINI et al. (1990) den photoperiodischen Effekt auf die Ausbildung hypobiotischer *H. contortus*-Stadien nicht bestätigen.

Auch die Bedeutung von Feuchtigkeit bezüglich der Auslösung der Entwicklungshemmung bedarf noch weiterer Untersuchungen. EYSKER (1978) erkannte, dass der Beginn der Hypobiose bei *H. contortus* und *T. circumcincta* in trockenen Sommern verzögert einsetzte. Nach Kultivierung von *H. contortus*-Larven unter sehr feuchten, modrigen Bedingungen stellte CONNAN (1978) einen signifikant höheren Prozentsatz inhibierter Larven fest als bei relativ trocken kultivierten Larven. Er bemerkte jedoch auch, dass letztere Larven eine herabgesetzte Infektiösität aufwiesen, was die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Kultivierungsmethoden erklären könnte.

2.2.3.2 Immunität des Wirtes

Nach GIBBS (1986) basiert einer der zwei Hypobiosetypen auf immunologischen Vorgängen. EYSKER (1993) stellte fest, dass bei permanent auf einer mit *O. ostertagi* kontaminierten Weide grasenden Kälbern bis zu 95 % der gesamten *O. ostertagi*-Wurmbürde von inhibierten Stadien repräsentiert wurde. Dahingegen waren bei Kälbern, die nur für einen Zeitraum von 4 Tagen auf einer entsprechenden Weide grasten, lediglich 2 bis 16 % der Parasiten hypobiotisch. Der Autor erklärt den hohen Prozentsatz inhibierter Larven bei den permanent geweideten Kälbern mit der Entwicklung einer Wirtsimmunität. Auch bei täglicher Verabreichung einiger tausend *T. circumcincta*-Larven an Lämmer entwickelten die Tiere eine Immunität, welche mit einem hohen Prozentsatz inhibierter Larven einherging (GIBSON u. EVERETT 1978). Nach MICHEL (1978) handelt es sich dabei jedoch um eine allmähliche Akkumulation inhibierter Larven, wohingegen adulte Stadien über den Verlauf der Weidesaison verloren gehen. Immunisierungsversuche mit *D. viviparus* stützten die Annahme der Immunität als einen auslösenden Faktor der Hypobiose. Bei immunen Kälbern, die nach Reinfektion keine

Larven ausschieden, wurden im Zuge der Sektion sehr kleine, wahrscheinlich inhibierte Larven aufgefunden (MICHEL 1955). Ebenfalls vermehrt hypobiotische Larvenstadien traten nach der Reinfektion von Kälbern auf, die mit einem röntgenattenuierten Vakzinestamm geimpft worden waren (MICHEL et al. 1965). Ähnliches beobachtete EYSKER (1981b) für *H. contortus* bei zuvor immunisierten Lämmern. Die Immunisierung wurde dabei mit gekühlten Larven durchgeführt. Der Autor schlussfolgert, dass inhibierte Larven ihrerseits immunogen sind. Immunisierungsversuche mit Hypobiose induzierten und nicht induzierten *O. ostertagi*-Larven bestätigen dieses (CHRISTENSEN et al. 1992).

2.2.3.3 Altersresistenz des Wirtes

Das vermehrte Auftreten entwicklungsgehemmter Stadien bei älteren Tieren wurde bereits bei *D. viviparus* (MICHEL et al. 1965), *O. ostertagi* (MICHEL et al. 1979; KLESIUS 1988), *C. oncophora* (KLOOSTERMAN et al. 1991) und *H. contortus* (EYSKER 1993) beobachtet. KLOOSTERMAN et al. (1991) sowie MICHEL et al. (1979) schreiben dabei dem Alter der Tiere eine Rolle bei der Induktion der Entwicklungshemmung zu. KLOOSTERMAN et al. (1991) stellten einen offensichtlichen Effekt der Altersresistenz auf *C. oncophora* fest, auf *O. ostertagi* hingegen besaß das Alter der Tiere keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu beschreiben MICHEL et al. (1979) eine Altersresistenz bei *O. ostertagi*. Bei empfänglichen Rindern im Alter von 21 Monaten waren nach experimenteller Infektion 27 % der Parasiten inhibiert, in Kälbern konnte keine Entwicklungshemmung erkannt werden. Der Effekt des Alters wird dabei durch vorangegangene Immunisierung potenziert. So erhöhte sich der Prozentsatz inhibierter Stadien bei 21 Monate alten, immunen Tieren auf 86 %. Bei immunen Kälbern waren nur 23 % der Parasiten in ihrer Entwicklung inhibiert. Ob die Kompensationsfähigkeit älterer Tiere bezüglich der vom Parasiten ausgelösten Suppression der spezifischen und unspezifischen Immunantwort (KLESIUS 1988) diese Altersresistenz bedingt, ist bislang nicht geklärt.

2.2.3.4 Infektionsdosis

Mit steigender Infektionsdosis konnte bei verschiedenen Trichostrongyliden des Schafes eine erhöhte Anzahl inhibierter Stadien im Wirtsorganismus beobachtet werden (DUNSMORE

1960). Auch EYSKER (1993) erkannte vermehrt hypobiotische *O. ostertagi*-Larven bei Kälbern, die über eine Weideperiode hinweg auf einer sehr stark kontaminierten Fläche weideten. Er brachte dies jedoch in Zusammenhang mit einer erworbenen Immunität der Tiere. Nach MICHEL (1978) kann dies auch eine Ansammlung inhibierter Larven darstellen, da infolge der hohen Infektionsdosen insgesamt eine höhere Parasitenbürde resultiert.

2.2.3.5 Genetische Determination

Verschiedene Autoren (BLITZ u. GIBBS 1972a; ARMOUR u. BRUCE 1974; CAPITINI et al. 1990; FERNANDEZ et al. 1999) gehen davon aus, dass die Hypobiose eine genetisch manifestierte, obligate Überlebensstrategie der Parasiten darstellt. Hinweisend für eine genetische Regulation ist dabei die Möglichkeit der Selektion auf oder gegen die Fähigkeit zur Hypobiose. So konnten WATKINS u. FERNANDO (1984) bei *Obeliscoides cuniculi*, einem Nematoden des Kaninchens, durch Selektion auf Entwicklungshemmung in nur fünf Generationen den Anteil inhibierter Stadien nach kühler Lagerung von 15 auf 90 % steigern. Auch das Produktionssystem kann eine solche Selektion bedingen. Auf einer Farm in New South Wales fanden SMEAL u. DONALD (1982a) bei den dort gehaltenen Fleischrindern einen höheren Anteil hypobiotischer *O. ostertagi*-Larven als bei Milchrindern. Die Autoren sahen die Erklärung für diese Tatsache in der unterschiedlichen Verfügbarkeit neuer Wirte. Während im Zuge des intensiven Milchvieh-Managements ständig neue Kälber geboren werden, kalben Fleischrinder nur einmal jährlich im Frühling. Somit sind die Parasiten zur Erhaltung ihrer Population auf die Fähigkeit zur Entwicklungshemmung angewiesen. Eine Selektion gegen die Hypobiosefähigkeit tritt des Öfteren unter Laborbedingungen auf, da das Larvenmaterial für künftige Passagen meist zu Beginn der Patenz gesammelt wird. Nach mehreren Passagen eines *O. ostertagi*-Stammes sprach dieser nicht mehr auf externe, Hypobiose induzierende Stimuli an (ARMOUR et al. 1967). Auch BORGSTEEDE u. EYSKER (1987) beobachteten unter Feldbedingungen eine verminderte Ansprechbarkeit eines *O. ostertagi*-Stammes, der zuvor über einen Zeitraum von fünf Jahren in einem Labor passagiert worden war. Des Weiteren verdeutlichten reziproke Transferexperimente geographisch isolierter *O. ostertagi*-Populationen die genetische Grundlage der saisonbedingten Induktion der Hypobiose (SMEAL u. DONALD 1981; FRANK et al. 1986; FRANK et al. 1988).

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten bei *H. contortus* zwei nicht näher charakterisierte Proteine identifiziert werden, die während der Induktion der Larven zur Entwicklungshemmung stark anstiegen. Bei nicht Hypobiose induzierten Larven sowie einem nicht zur Hypobiose fähigen Laborstamm waren diese Proteine nicht in diesem Ausmaß vorhanden (KOOYMAN u. EYSKER 1995). DOPCHIZ et al. (2000) stellten bei Hypobiose induzierten *O. ostertagi*-Larven ein verändertes Proteinprofil im Bereich von 66 bis 77 kDa fest, dessen Proteingehalt im Vergleich mit nicht induzierten Larven um den Faktor 5,25 erhöht war. Innerhalb dieser Region fanden sich zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 75,4 bzw. 70 kDa mit einer um den Faktor 4,45 respektive 44,16 gesteigerten Proteinmenge bei den Hypobiose induzierten Larven. RICKLING (1999) untersuchte auf mRNA-Ebene Unterschiede der Gentranskription mit Hilfe des Differential Displays bei Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten *D. viviparus*-Larven. Die 37 als differentiell transkribiert ermittelten Genfragmente konnten jedoch nicht komplettiert werden. Auch eine Verifizierung dieser Fragmente mittels spezifischer RT-PCR misslang.

Bei dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* liegen bereits viele Erkenntnisse über die genetische Regulation der Entwicklungshemmung vor. GIBBS (1986) spekuliert, dass der letztliche Stimulus für die Auslösung der Hypobiose in Analogie zu *C. elegans* ein vom Parasiten selbst produziertes Pheromon sein könnte. BURGLIN et al. (1998) sieht in diesem Erdnematoden sogar einen Modellorganismus für parasitische Nematoden und auch EYSKER (1997) hält es für lohnend, bei parasitischen Nematoden nach der Existenz von Genen, die bei *C. elegans* in die Entwicklungshemmung involviert sind, zu forschen und erhofft hieraus einen Erkenntnisgewinn über die Entwicklung dritter parasitischer Stadien. RICKLING (1999) untersuchte mit sequenzspezifischen Primerpaaren für fünf Gene, die bei *C. elegans* in die Entwicklungshemmung involviert sind, genomische DNA und cDNA Hypobiose induzierter und nicht induzierter dritter *D. viviparus*-Larven sowie eines nicht zur Hypobiose befähigten Vakzinestammes. Bei einem Teil der Reaktionsansätze waren nach der anschließenden Gelelektrophorese Amplifikationsprodukte feststellbar. RICKLING (1999) hält es daher für möglich, dass die *C. elegans*-Gene, für welche ein Amplifikat erzeugt werden konnte, auch im Genom der Lungenwürmer vorhanden sind. Dies bedarf jedoch der weiteren Überprüfung, da die Amplifikate keiner weiteren Charakterisierung unterzogen wurden.

2.3 Entwicklungshemmung bei *C. elegans*

Bei dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* ist viel über die genetische Regulation der Entwicklungshemmung bekannt. Auf Grund der Vielzahl an Genen, die bei *C. elegans* in den hypobiotischen Prozess involviert sind, soll im Folgenden nur auf die *daf*-Gene näher eingegangen werden, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Larvenentwicklung spielen und unter anderem in drei Signalkaskaden involviert sind. Durch Studien an Mutanten konnten die *daf*-Gene in zwei generelle Klassen eingeteilt werden: Die *daf-d* (*dauer formation defective*) Mutanten sind nicht zur Entwicklungshemmung befähigt (GOLDEN u. RIDDLE 1984a). Im Gegensatz dazu entwickeln sich die *daf-c* (*dauer formation constitutive*) Mutanten unabhängig von auslösenden Faktoren zu inhibierten Stadien (SWANSON u. RIDDLE 1981; GOLDEN u. RIDDLE 1984a).

Bei geringer Populationsdichte erreicht *C. elegans* innerhalb von drei Tagen nach dem Schlupf über vier larvale das adulte Stadium. Jedoch kann sich mit der zweiten Häutung ein fakultatives juveniles Stadium, die so genannte „*dauer larva*", entwickeln. Diese Formation ist eine Antwort auf Überbevölkerung und wird durch ein vom Nematoden produziertes Pheromon induziert, dessen Sekretion mit zunehmender Populationsdichte steigt. Modulierend wirken Nahrungsangebot und Umgebungstemperatur. Fördernd sind dabei Temperaturen über 22 °C und ein Mangel an ubiquitären Bakterien, welche *C. elegans* als Nahrungsquelle dienen. Diese drei Faktoren regulieren auch das *recovery*, das heißt die Wiederaufnahme der Entwicklung zum adulten Nematoden (GOLDEN u. RIDDLE 1982; GOLDEN u. RIDDLE 1984a; GOLDEN u. RIDDLE 1984b).

2.3.1 Besonderheiten der *dauer larva*

Die in ihrer Entwicklung inhibierte *dauer larva* lässt sich anhand bestimmter Kennzeichen von normal entwickelten Larven unterscheiden. Morphologisch erscheint sie durch radiäre Schrumpfung sehr dünn, besitzt keine Pharynx- oder Darmöffnung und die Darmzellen wirken dunkel (CASSADA u. RUSSELL 1975). Auch exkretorische Drüsen (NELSON et al. 1983) und sensorische Organe (ALBERT u. RIDDLE 1983) weisen eine Hypobiose spezifische Morphologie auf. Ferner ist die äußere Kutikula dicker und mit einer zusätzlichen

Schicht unterlegt (POPHAM u. WEBSTER 1978), was dem Nematoden eine besondere Resistenz gegen schadhafte Umwelteinflüsse verleiht (ALBERT u. RIDDLE 1988). Die in der Entwicklung gehemmte Larve zeigt weiterhin eine reduzierte Aktivität. Meist liegt sie lang gestreckt und bewegungslos, reagiert aber sofort auf mechanische Stimuli. Das pharyngeale Pumpen ist völlig eingestellt. Verbessern sich die Lebensbedingungen, beginnt der Nematode innerhalb von vier Stunden mit der Nahrungsaufnahme und häutet sich zur vierten Larve (CASSADA u. RUSSELL 1975). Die *dauer larva* wird auch als nicht alterndes Stadium bezeichnet, da sie mehrere Monate überlebt und die Lebensspanne der sich aus ihnen entwickelnden Adulten die für *C. elegans* normalen zwei Wochen beträgt (KLASS u. HIRSH 1976).

2.3.2 Chemosensorische Kontrolle der Larvenentwicklung

Wie im Kapitel 2.3 beschrieben, wird bei *C. elegans* die Entwicklungshemmung hauptsächlich vom Pheromonspiegel in der Umgebung bestimmt, dessen Höhe von der Populationsdichte abhängt. Die Produktion dieses Pheromons wird wahrscheinlich durch das Gen *daf*-22 reguliert. GOLDEN u. RIDDLE (1985) stellten fest, dass entsprechende Mutanten kein Pheromon produzieren, aber auf exogen zugeführtes Pheromon mit der Ausbildung der *dauer larva* reagieren. Die Antwort auf das Pheromon hängt von bilateral symmetrischen Amphiden ab (VOWELS u. THOMAS 1994), deren zwölf Neuronen in den Ganglien des Kopfes lokalisiert sind. Von dort aus ziehen afferente Neuronenbahnen lateral an die Mundöffnung zu einer Pore in der Kutikula, welche von einer Stützzelle gebildet wird. Eine Scheidenzelle umgibt einige der zilienbesetzten Nervenendigungen. Die jeweils acht chemosensorischen Nervenendigungen der Amphide sind direkt der Umwelt exponiert (WARE et al. 1975; WARD et al. 1975). Die chemosensorischen Neurone ADF, ASI sowie ASG regulieren die Produktion eines TGF-β-Signals und hemmen so die Bildung der *dauer larva* (GEORGI et al. 1990; BARGMANN u. HORVITZ 1991; ESTEVEZ et al. 1993; REN et al. 1996). Dahingegen werden die ASJ-Neuronen, deren Regulation cGMP-gesteuerte Ionenkanäle unterliegen, sowohl für den Eintritt in das inhibierte Stadium als auch ein effizientes *recovery* benötigt (BARGMANN u. HORVITZ 1991; VOWELS u. THOMAS 1992; THOMAS et al. 1993; SCHACKWITZ et al. 1996; COBURN et al. 1998). Mutationen dieser Einheit resultieren in

abnormalem chemosensorischen Verhalten und gestörter larvaler Entwicklung. So besitzen *daf*-6-Mutanten defekte Scheidenzellen, *daf*-10-Mutanten defekte Zilien in Amphiden und Phasmiden (ALBERT et al. 1981; HERMAN 1987). Die betroffenen Individuen bilden auch bei hohem Pheromonspiegel keine inhibierten Stadien aus. Das vollständige Fehlen von sensorischen Zilien resultiert aus einem Funktionsverlust des Gens *daf*-19, welches *daf*-24 entspricht. Dieser Transkriptionsfaktor vom RFX-Typ reguliert dabei die Expression der Ziliengene (SWOBODA et al. 2000). Im Gegensatz zu allen anderen Mutationen der Zilienstrukturgene geht dies mit einem *daf-c* Phänotyp einher (PERKINS et al. 1986).

2.3.3 Signalkaskaden zur Regulation der Larvenentwicklung

In Abhängigkeit von den drei Umweltfaktoren Pheromonspiegel, Nahrungsangebot und Temperatur kontrollieren drei sich funktionell überlappende Wege die Larvenentwicklung über neuronale Impulse. Diese Signalkaskaden stellen parallele Wege zweier Gruppen von *daf-c* Genen dar und steuern aktiviert die normale Larvenentwicklung über den nukleären Rezeptor *daf*-12. Bleiben die Signale dieser Wege aus, erfolgt die Morphogenese zur *dauer larva*.

2.3.3.1 Signalweg über zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Die Gene *daf*-11 und *daf*-21, welche die Gruppe 1 der *daf-c* Gene repräsentieren, vermitteln auf derselben Stufe die chemosensorische Signaltransduktion in verschiedenen der Umwelt exponierten Amphidneuronen (VOWELS u. THOMAS 1992; VOWELS u. THOMAS 1994; BIRNBY et al. 2000). Bei dem *daf*-21 Genprodukt handelt es sich um das Hitzeschockprotein 90, welches in den inhibierten Larven 15fach angereichert ist (DALLEY u. GOLOMB 1992; BIRNBY et al. 2000). BIRNBY et al. (2000) vermuten, dass dieses Chaperon mit dem *daf*-11 Genprodukt assoziiert ist und dessen inaktive Form oder ein noch unbekanntes Protein, welches für die chemosensorische Transduktion von *daf*-11 benötigt wird, stabilisiert. *daf*-11, welches in den ASI-, ASJ- und anderen chemosensorischen Neuronen exprimiert wird, codiert für eine transmembranale Guanylyl-Cyclase (TM-GC) und katalysiert die Bildung von cGMP aus GTP (BIRNBY et al. 2000). cGMP fungiert als *second messenger*, der Kinasen, andere Nukleotid-Cyclasen, Phosphodiesterasen und cGMP-gesteuerte Ionenkanäle reguliert.

Bei nicht Hypobiose induzierenden Bedingungen unterdrückt *daf*-11 noch unbekannte Faktoren in den ASI- und ASJ-Neuronen. Damit wird die dauer-fördernde Aktivität der ASJ-Neuronen inhibiert und gleichzeitig in den ASI-Neuronen die Transkription von *daf*-7, welches den TGF-β Signalweg einleitet, gesteigert (BIRNBY et al. 2000; MURAKAMI et al. 2001). Ferner aktiviert *daf*-11 in den ASI- sowie ASJ-Neuronen die Transkription von *daf*-28 und ist somit auch an der Regulation des insulinartigen Signalwegs beteiligt (LI et al. 2003).

2.3.3.2 Insulinartige Signalkaskade

Die Transkription von *daf*-28, einem Insulin vom β-Typ, findet in den ASI- und ASJ-Neuronen statt und wird bei nicht Hypobiose induzierenden Bedingungen durch *daf*-11 (Kapitel 2.3.3.1) gesteigert, unter Pheromoneinwirkung und Nahrungsmangel hingegen stark reprimiert. Vermutlich beeinflusst auch *daf*-7 (Kapitel 2.3.3.3) die Transkriptionsrate von *daf*-28 und anderen Insulinliganden positiv und ist somit neben *daf*-11 an der Regulation des insulinartigen Signalwegs, welcher neben dem TGF-ß Signalweg die Gruppe 2 der *daf-c* Gene darstellt, beteiligt (LI et al. 2003). Auch gehen die Autoren davon aus, dass *daf*-28 einen Liganden für *daf*-2 repräsentiert. Dieses Gen codiert für eine Insulin/IGF-1 Rezeptor-Tyrosinkinase (KIMURA et al. 1997) und reguliert Lebensspanne, Metabolismus sowie Reproduktion des Nematoden über parallele Signalkaskaden. Die Bindung des Liganden an *daf*-2 induziert einerseits die Autophosphorylierung von *age*-1 (früher als *daf*-23 bezeichnet), einer Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase (MORRIS et al. 1996; KIMURA et al. 1997), welche die *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4-biphosphat (PIP2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) generiert. PIP2 phosphoryliert das Genprodukt von *pdk*-1, eine Akt/PKB-Kinase, welche wiederum die Serin/Threonin-Kinasen *akt*-1 und *akt*-2 aktiviert, wobei deren Aktivierung auch direkt über PIP3 erfolgt (PARADIS u. RUVKUN 1998; PARADIS et al. 1999).

Auf der anderen Seite kontrolliert *daf*-2 in multiplen Gruppen von Signalzellen die Produktion oder Aktivität eines zweiten, noch unbekannten Signals, welches die Entwicklung und Lebensspanne verschiedener Gewebe reguliert (APFELD u. KENYON 1998). Beide Wege antagonisieren letztlich *daf*-16 (ehemals auch als *daf*-17 bezeichnet) bezüglich seiner fördern-

den Aktivität auf die Ausbildung der *dauer larva* (PARADIS u. RUVKUN 1998; TANG et al. 1999; CAHILL et al. 2001; HENDERSON u. JOHNSON 2001; LEE et al. 2001; LIN et al. 2001). Das Gen *daf*-16 codiert für drei Isoformen eines *Forkhead* Transkriptionsfaktors, welche durch alternatives Splicing entstehen. Diese Isoformen besitzen unterschiedliche DNA-Bindungsdomänen und interagieren vermutlich mit verschiedenen Partnern oder binden an unterschiedliche Promotoren (LIN et al. 1997; OGG et al. 1997). Bei günstigen Umweltbedingungen befinden sich die *daf*-16 Genprodukte im Zytoplasma und regulieren ein schnelles Wachstum sowie die Reproduktion von *C. elegans*. Verschlechtern sich die Lebensbedingungen, gelangen die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und verzögern Wachstum und Reproduktion, dahingegen werden Stressresistenz und Lebensdauer gesteigert. Die Phosphorylierung der *daf*-16 Transkriptionsfaktoren durch die *daf*-2-, *akt*-1- und *akt*-2-Kinase verhindert deren Akkumulation im Zellkern und damit die Entwicklungshemmung (HENDERSON u. JOHNSON 2001; LIN et al. 2001).

Einen negativen Regulator der insulinartigen Signalkaskade stellt *daf*-18, ein PTEN Tumorsuppressor-Homolog, dar. Diese PIP3-Phosphatase antagonisiert die Funktion der *age*-1 PI3-Kinase und fördert so die Entwicklungshemmung (GIL et al. 1999; MIHAYLOVA et al. 1999; ROUAULT et al. 1999). In der relativen Konzentration und Aktivität von *daf*-18 respektive *age*-1 vermuten GIL et al. (1999) einen kritischen Punkt für die weitere Larvenentwicklung von *C. elegans*. Die negative Regulation von *daf*-18 erfolgt dabei über die *daf*-2 Genaktivität (MIHAYLOVA et al. 1999). LEE et al. (2001) sehen in *daf*-18 ein potentielles Verbindungsglied zwischen dem insulinartigen und TGF-ß-Signalweg (Kapitel 2.3.3.3), welcher ebenfalls die zelluläre Lokalisation von *daf*-16 reguliert. Wie in kultivierten Säugetierzellen beobachtet, könnte TGF-β die PTEN-Transkriptionsrate senken, dadurch die Aktivität der *akt*-1- und *akt*-2-Serin/Threonin-Kinasen steigern und somit die nukleäre Akkumulation von *daf*-16, welche die Bildung der *dauer larva* zur Folge hat, verhindern (LEE et al. 2001).

2.3.3.3 Transforming Growth Factor-ß (TGF-β) Signalweg

Bei dem Erdnematoden *C. elegans* sind nach PATTERSON u. PADGETT (2000) drei Liganden der TGF-β Superfamilie bekannt. Einer dieser Liganden, nämlich *daf*-7, ist in den Sig-

nalweg zur Regulation der *dauer larva* involviert. Die pheromongesteuerte, durch *daf*-11 aktivierte Transkription des *daf*-7-Gens, welches für ein TGF-β-Homolog codiert, findet in den ASI-Neuronen statt und fördert die normale Larvenentwicklung (REN et al. 1996; SCHACKWITZ et al. 1996; MURAKAMI et al. 2001; LI et al. 2003). Bindet das TGF-β-Homolog an *daf*-4, eine Typ II Rezeptor-Serin/Threoninkinase (ESTEVEZ et al. 1993), aktiviert diese wiederum eine Kinase vom Typ I, das Genprodukt von *daf*-1 (GEORGI et al. 1990). Nach GUNTHER et al. (2000) kann der Signalweg auch nur über die Typ I Serin/Threoninkinase erfolgen, jedoch ist die Bindungsaffinität von *daf*-7 für den *daf*-4/*daf*-1-Komplex höher als für *daf*-1 allein. Der phosphorylierte Typ I Rezeptor aktiviert seinerseits die Smad Proteine *daf*-8 und *daf*-14 (PATTERSON u. PADGETT 2000; INOUE u. THOMAS 2000b). Diese regulatorischen Smads interagieren mit Co-Smads, woraufhin der Komplex in den Zellkern gelangt und dort mit anderen Faktoren die Transkription der Zielgene aktiviert oder reprimiert. Hierfür besitzen Smads zwei konservierte Domänen: MH1 für die Vermittlung der DNA-Bindung und Interaktionen mit Proteinen, sowie MH2, welche die Aktivierung der Transkription bedingt und mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. INOUE u. THOMAS (2000b) stellten fest, dass *daf*-14 keine DNA-Bindungsdomäne besitzt und daher die Transkription nicht direkt beeinflussen kann. Ähnliches vermuten die Autoren für *daf*-8. Die Aktivierung von Genen für die reproduktive Entwicklung und assoziierten metabolischen Genen erreichen *daf*-14 und *daf*-8 über eine Komplexbildung mit dem Co-Smad *daf*-3, welches bei alleiniger Aktivität die Bildung der *dauer larva* mit entsprechenden Metabolismus bewirkt (PATTERSON et al. 1997; THATCHER et al. 1999; PATTERSON u. PADGETT 2000; INOUE u. THOMAS 2000a). Das bisher nicht klonierte Gen *daf*-5 steht auf derselben Stufe des Signalwegs zur Entwicklungshemmung wie *daf*-3. Daher nehmen verschiedene Autoren an, dass auch *daf*-5 negativ über die TGF-β Signalkaskade reguliert wird (THATCHER et al. 1999; PATTERSON u. PADGETT 2000).

Neben der Regulation von *daf*-18 durch *daf*-7 (Kapitel 2.3.3.2) könnten auch die Smad Proteine die Verbindungsglieder zwischen dem TGF-β und insulinartigen Signalweg darstellen. OGG et al. (1997) sowie PATTERSON et al. (1997) vermuten, dass der *Forkhead* Transkriptionsfaktor *daf*-16 mit *daf*-3, *daf*-8 oder *daf*-14 interagiert. So könnte *daf*-16 unter Hypobiose induzierenden Bedingungen mit *daf*-3 einen Komplex bilden und so die notwendigen Gene regulieren (OGG et al. 1997), wohingegen im Zuge der reproduktiven Entwicklung *akt*-1 und

akt-2 diese Komplexbildung durch Phosphorylierung des *daf*-16 Genprodukts inhibieren würden (PARADIS u. RUVKUN 1998).

2.3.4 Zielpunkt der Signalkaskaden

Die TGF-β Signalkaskade sowie der insulinartige und cGMP-Signalweg besitzen letztlich als Zielgen das ehemals auch als *daf*-20 bezeichnete Gen *daf*-12 (RIDDLE et al. 1981; VOWELS u. THOMAS 1992; THOMAS et al. 1993; GOTTLIEB u. RUVKUN 1994; LARSEN et al. 1995; GRENACHE et al. 1996). Dieses Gen, welches sowohl für die Entwicklungshemmung als auch das *recovery* verantwortlich ist, codiert für drei Isoformen eines nukleären Rezeptors (ANTEBI et al. 1998). Die zwei *daf*-12a Isoformen besitzen je eine Liganden- als auch DNA-Bindungsdomäne und bedingen die normale Larvenentwicklung. Die Isoform *daf*-12a1 weist dabei Homologien zu einem Steroid/Thyroid-Hormonrezeptor von *Strongyloides stercoralis* sowie Vitamin D-Rezeptoren verschiedener Vertebraten auf. Dahingegen enthält das *daf*-12b Genprodukt, welches die Ausbildung der *dauer larva* fördert, nur die Bindungsdomäne für einen Liganden (ANTEBI et al. 1998; ANTEBI et al. 2000; SNOW u. LARSEN 2000). Oftmals aktivieren nukleäre Rezeptoren die Gentranskription in Anwesenheit von Hormonen und unterdrücken sie bei deren Fehlen. Mehrere Autoren vermuten daher einen hormonellen Mechanismus bei der Regulation der normalen oder inhibierten Entwicklung sowie der Lebensspanne der Adulten (ANTEBI et al. 1998; ANTEBI et al. 2000; SNOW u. LARSEN 2000; GERISCH et al. 2001). Allerdings ist bisher nicht bekannt, welcher Ligand an den nukleären Rezeptor *daf*-12 bindet. Diesbezüglich könnte das für ein Cytochrom P450 codierende Gen *daf*-9, welches in sensorischen Neuronen exprimiert wird, eine Schlüsselrolle einnehmen (GERISCH et al. 2001; JIA et al. 2002). In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass die neuronale Expression dieser Cytochrome der Synthese von Steroiden dient. JIA et al. (2002) und GERISCH et al. (2001) schließen aus ihren Untersuchungen, dass Cholesterol den Vorläufer für das Substrat von *daf*-9 darstellt und dieses Gen daher in die Synthese des *daf*-12 Liganden involviert ist oder einen Liganden für einen anderen nukleären Rezeptor bereitstellt, welcher als Transkriptionsrepressor und auch Partner der verschiedenen *daf*-12 Isoformen fungiert.

Wie die drei Signalkaskaden letztlich die inhibierte oder normale Larvenentwicklung bedingen, ist noch nicht vollständig geklärt. Bei Wirbeltieren wird das Zusammenspiel der Signale von TGF-β- und Vitamin D-Rezeptoren über Smad Proteine vermittelt, welche als Liganden-abhängige Koaktivatoren der Vitamin D-Rezeptoren fungieren. Alternativ könnten die drei Signalwege einzeln oder in Kombination die Biosynthese oder Verfügbarkeit lipophiler Hormone kontrollieren, die den *daf*-12 Rezeptor-Transkriptionskomplex aktivieren (ANTEBI et al. 2000). Dafür spricht, dass sowohl der *daf*-2 Insulin/IGF-1- als auch der *daf*-4 Typ II TGF-ß-Rezeptor den Metabolismus und die inhibierte Entwicklung „*cell nonautonomously*“, also über ein sekundäres Signal vermitteln (APFELD u. KENYON 1998; WOLKOW et al. 2000; INOUE u. THOMAS 2000b). Dieses könnte *daf*-9 generieren und damit den TGF-β- und insulinartigen Signalweg verbinden, welche die dauer-fördernde Aktivität von *daf*-3, *daf*-5 und *daf*-16 unterdrücken. Dadurch würde, direkt oder indirekt, *daf*-9 aktiviert. Das daraufhin von *daf*-9 synthetisierte Hormon aktiviert wiederum den *daf*-12a Transkriptionskomplex mit der Folge einer normalen Larvenentwicklung. Unter ungünstigen Umweltbedingungen hingegen würde die *daf*-9 Aktivität von *daf*-3, *daf*-5 und *daf*-16 inhibiert, eventuell über Substratentzug. Somit könnte das Hormon für *daf*-12a nicht synthetisiert werden und der *daf*-12b Komplex würde die Bildung der *dauer larva* initiieren (GERISCH et al. 2001; JIA et al. 2002).

Inwiefern die übrigen, bislang nicht klonierten *daf*-Gene (durchnumeriert bis *daf*-36) in die Kontrolle der Larvenentwicklung einbezogen sind, ist noch weitgehend unklar. So ist über das Gen *daf*-15 bekannt, dass es auf derselben Stufe wie *daf*-9 agiert und mutiert einen *daf-d*-Phänotyp verursacht (ALBERT u. RIDDLE 1988). Ob funktionelle Verbindungen oder Parallelen zwischen *daf*-15 und *daf*-9 bestehen, wird zurzeit erforscht.

2.3.5 Homologe von *daf*-Genen bei parasitischen Nematoden

GOMEZ-ESCOBAR et al. (2000) identifizierten bei dem filaroiden Nematoden *Brugia malayi* ein *daf*-7 Homolog. Die Autoren vermuten jedoch eher eine immunmodulatorische als eine wachstums- und differenzierungsfördernde Funktion dieses Proteins wie es bei *C. elegans* der Fall ist. Weiterhin wurde bei *B. pahangani* ein Homolog des *daf*-7 Gens festgestellt (GOMEZ-ESCOBAR et al. 1997). Auch konnten bei *Strongyloides stercoralis* Orthologe des

daf-12-Gens, welches bei *C. elegans* in die Formation der *dauer larva* involviert ist (SIDDIQUI et al. 2000) sowie *gpa*-2- und *gpa*-3-Orthologe (MASSEY, JR. et al. 2001) gefunden werden. Es ist jedoch zu bedenken, dass dieser Parasit nicht zur Hypobiose befähigt ist. Ferner kann in den Entwicklungszyklus eine frei lebende Generation eingeschaltet werden. Die Gattung *Strongyloides* repräsentiert somit einen Mediator zwischen den obligat parasitischen und frei lebenden Nematoden.

Bezüglich der Reaktivierung hypobiotischer Larven bestehen bei *C. elegans* und *Ancylostoma caninum* offensichtlich ähnliche Verhältnisse. TISSENBAUM et al. (2000) stellten fest, dass muscarinerge Agonisten bei beiden Organismen die Weiterentwicklung fördern, wohingegen der muscarinerge Antagonist Atropin diese inhibiert. Die Autoren schließen daraus einen Signalweg über Acetylcholin, welcher das insulinartige Signal während des *recovery* von *C. elegans* aktiviert und vermuten, dass auch die Reaktivierung hypobiotischer Hakenwurmlarven über ein insulinartiges Signal von Seiten des Wirtes oder des Parasiten vermittelt wird. ARASU (2001) beobachtete einen stimulatorischen Effekt der TGF-β Isoformen 1 und 2 auf die Reaktivierung inhibierter *A. caninum*-Larven. Das während der Gravidität vom Wirt vermehrt synthetisierte TGF-β2 könnte über einen Rezeptor des Parasiten dessen Weiterentwicklung fördern (ARASU 2001). Untersuchungen ergaben ferner, dass cGMP die Aktivierung dritter, infektiöser Hakenwurmlarven vermittelt (HAWDON u. DATU 2003). Nach Meinung der Autoren ist diese „Aktivierung zum Parasitismus“ analog der Aufhebung der Entwicklungsinhibition von *C. elegans*, so dass die Signalwege für dessen *recovery* als Modell für die Wirtsinfektion mit *A. caninum* und anderen Parasiten dienen könnte.

2.4 Ermittlung differentiell transkribierter Gene

Eine differentielle Gentranskription verschiedener Populationen oder Gewebe resultiert in mRNA-Populationen, die Konzentrationsunterschiede bezüglich der mRNAs aufweisen, welche von induzierten bzw. reprimierten Genen transkribiert werden. Um diese Gene aus der großen Überzahl nicht differentiell transkribierter Gene zu ermitteln, wurden eine Vielzahl von Verfahren, wie das Differential Screening (TEDDER et al. 1988), RNA-Fingerprinting (LIANG u. PARDEE 1992; WELSH et al. 1992), subtraktive Hybridisierungsverfahren

(SARGENT u. DAWID 1983; HUBANK u. SCHATZ 1994; DIATCHENKO et al. 1996), cDNA Array Hybridisierung (SCHUMMER et al. 1997) sowie die serielle Analyse der Genexpression (VELCULESCU et al. 1995) entwickelt. Im Folgenden sollen einige der am häufigsten genutzten Methoden eingehender Erwähnung finden.

2.4.1 Fingerprinting-Verfahren

2.4.1.1 Differential Display (DD)

Das von LIANG und PARDEE (1992) entwickelte Differential Display (DD) stellt eins der ersten auf einer PCR basierenden Verfahren zur Identifikation differentiell transkribierter Gene dar. Bei dieser Methode, welche in Abb. 1 schematisch dargestellt ist, wird zunächst cDNA der zu vergleichenden Populationen synthetisiert. Dabei kann sowohl mRNA als auch Gesamt-RNA revers transkribiert werden (LIANG u. PARDEE 1992; LIANG et al. 1993; LIANG et al. 1995; VELCULESCU et al. 1995b; LIANG u. PARDEE 1997). Da in der späteren PCR Zufallsprimer Verwendung finden, ist eine vollständige Entfernung chromosomaler DNA aus der isolierten RNA durch eine DNase unerlässlich (LIANG et al. 1993; LIANG et al. 1993; LIANG et al. 1995; LIANG u. PARDEE 1997). Als Primer für die Reverse Transkriptase dienen Oligo-(dT)-Primer mit ein (LIANG et al. 1993) oder zwei zusätzlichen Nukleotiden (LIANG u. PARDEE 1992) am 3`-Ende, wobei für jeden Primer eine separate Reaktion angesetzt wird. Die Zweitstrang-cDNA-Synthese und die anschließende Amplifikation erfolgen mit Hilfe von Zufallsprimern sowie dem entsprechenden Oligo-(dT)-Primer des reversen Transkriptionsansatzes. Die Amplifikationsprodukte werden anschließend auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die vergleichende Betrachtung der jeweils entstandenen Bandenmuster ermöglicht die Erkennung differentieller Transkripte. Die entsprechenden Banden werden isoliert, reamplifiziert und für die Sequenzanalyse kloniert.

2.4.1.2 RNA Arbitrarily Primed PCR (RAP-PCR)

Die in Abb. 1 dargestellte Methode der RNA Arbitrarily Primed PCR (RAP-PCR) basiert auf einem dem DD sehr ähnlichen Prinzip. Der wesentliche Unterschied besteht im Einsatz eines

(WELSH u. McCLELLAND 1990; WILLIAMS et al. 1990) oder zweier (WELSH u. McCLELLAND 1991) Zufallsprimer in der Erststrang-cDNA-Synthese in der RAP-PCR statt der beim DD verwendeten Oligo-(dT)-Primer. Daher kann die Arbitrarily Primed PCR neben dem RNA Fingerprinting (WELSH et al. 1992; MATHIEU-DAUDE et al. 1999) auch für ein genomisches Fingerprinting (WELSH u. McCLELLAND 1990; WILLIAMS et al. 1990; WELSH u. McCLELLAND 1991) eingesetzt werden. Bei ersterem werden durch die Zufallsprimer auch solche mRNAs erfasst, welche keine Poly-A-Ende besitzen, zudem ist die Analyse einer differentiellen Transkription verschiedener Exons möglich (WELSH et al. 1992; MATHIEU-DAUDE et al. 1999). Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese erfolgen bei der RAP-PCR unter wenig stringenten Bedingungen, woran sich eine stringente PCR anschließt. Daher wird die Methode insensitiv gegenüber moderaten Verunreinigungen mit genomischer DNA. Eine DNase-Behandlung der RNA ist somit im Gegensatz zum DD nicht erforderlich (MATHIEU-DAUDE et al. 1999).

2.4.1.3 Vorzüge und Limitierungen der Fingerprinting-Verfahren

Mittels der Fingerprinting-Verfahren besteht die Möglichkeit, mehr als zwei Populationen simultan vergleichen zu können. Ebenso gelingt es, sowohl induzierte als auch reprimierte Gene zu identifizieren (AIELLO et al. 1994). Weiterhin ist, insbesondere bei beschränktem Ausgangsmaterial, die geringe Menge von 100 ng mRNA bzw. 200 ng Gesamt-RNA, welche zur Durchführung benötigt wird, als ein Vorteil der Fingerprinting-Verfahren zu nennen.

Bei den Fingerprinting-Methoden ist jedoch zu bedenken, dass am Ende der PCR die Sequenzen reichlich vorhandener RNAs dominieren (BERTIOLI et al. 1995). Dahingegen können seltene RNAs, zu denen viele differentiell transkribierte Sequenzen zählen, oftmals nicht detektiert werden (WELSH et al. 1992; McCLELLAND et al. 1995), da die Amplifikationsreaktion teilweise empfindlich auf geringe Änderungen der Templatekonzentration reagiert (WELSH u. McCLELLAND 1990; WONG u. McCLELLAND 1993). Dies stellt eine der wichtigsten Limitierungen der RNA-Fingerprintings dar. Als sehr nachteilig erwies sich auch die hohe Zahl falsch positiver Banden, die beispielsweise bei unterschiedlicher Template-Qualität und Template-Konzentration der Proben auftreten. Diese beträgt beim Differential

Display zwischen 50 % und 75 %, bis hin zu 93 % (SUN et al. 1994; SOMPAYRAC et al. 1995; HARRIS et al. 1998). Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde das Originalprotokoll (LIANG u. PARDEE 1992) von zahlreichen Autoren (BAUER et al. 1993; GUIMARAES et al. 1995; LUCE u. BURROWS 1998; PIENTA u. SCHWAB 2000) modifiziert. Weiterhin decken Fingerprinting-Methoden durch den Einsatz von Zufallsprimern häufig nur einen Teil der mRNAs ab. Sie können daher für Untersuchungen, bei welchen nur wenige differentielle Transkripte erwartet werden, ungeeignet sein (SOMPAYRAC et al. 1995). Um alle der schätzungsweise 15 000 verschiedenen mRNAs zu visualisieren, werden nach LIANG u. PARDEE (1992) bzw. BAUER et al. (1993) für das Differential Display 240 respektive 312 Primerkombinationen benötigt. Spezifisch für das Differential Display ist, dass dieses sich auf Differenzen des 3´-Endes der transkribierten Sequenzen beschränkt. Solche in der 5´-Region, wie Varianten alternativ gespleißter mRNAs, werden meist nicht detektiert. Bezüglich des 3´-Endes ist die Methode infolge des Einsatzes eines Oligo(dT)-Primers allerdings auf poly-adenylierte mRNAs limitiert.

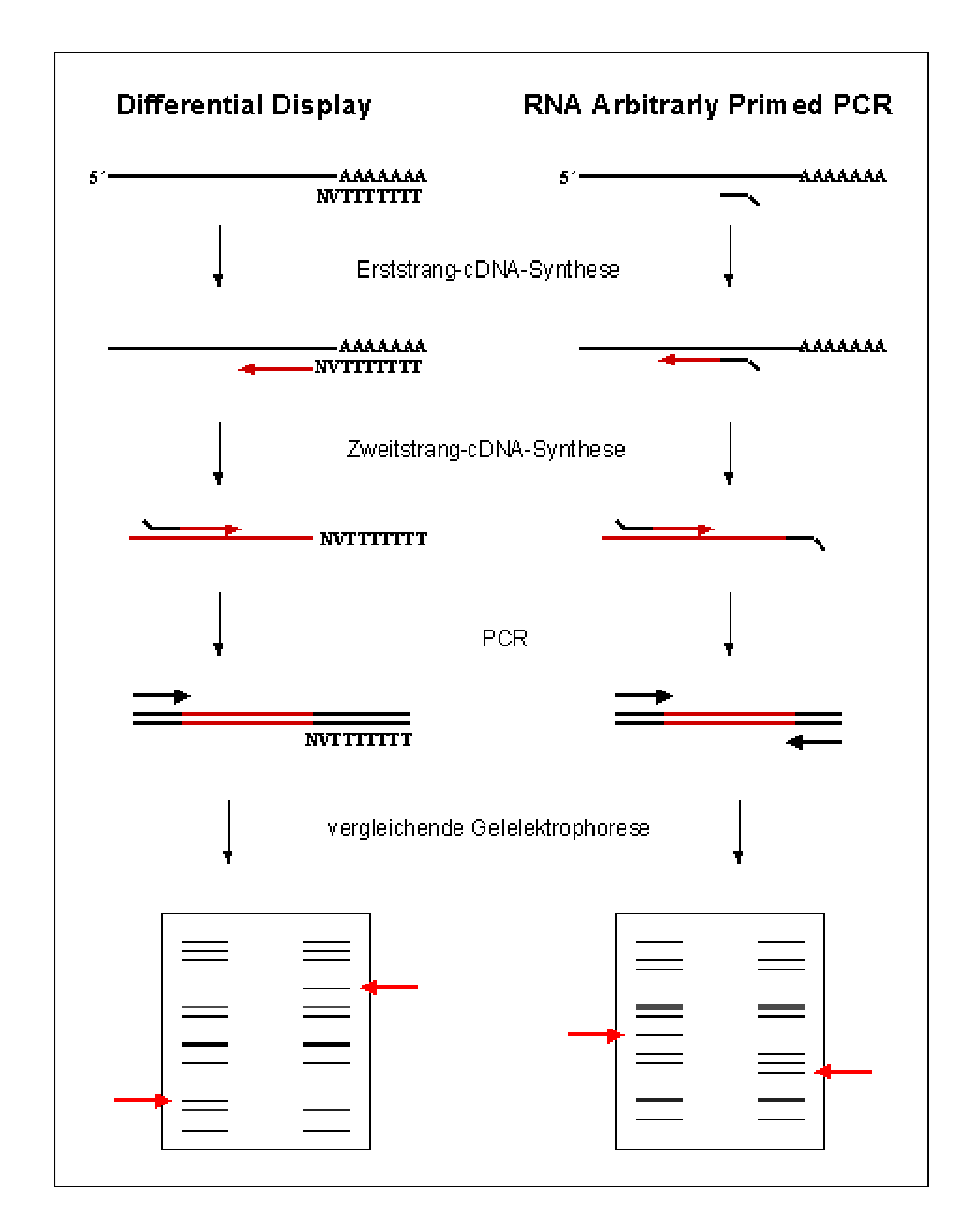


Abb. 1: Schema des Differential Display und der RNA Arbitrarily Primed PCR
(V = A, C, oder G; N = A, C, G oder T)

2.4.2 Subtraktive Hybridisierungsverfahren

Durch Einwirkung von Hitze oder Schaffung alkalischer Verhältnisse einzelsträngig vorliegende DNAs bzw. RNAs besitzen die Fähigkeit, über Basenpaarungen mit komplementären DNA- oder RNA-Strängen stabile Duplexe zu bilden. Dieser als Hybridisierung bezeichnete Vorgang wird bei verschiedenen Verfahren zur Analyse differentieller Transkripte genutzt.

Die subtraktive Hybridisierung, welcher eine Fragmentierung der Nukleinsäuren vorausgeht, ermöglicht die unmittelbare Konstruktion differentieller Banken aus genomischer DNA oder deren Transkripten (ERMOLAEVA u. SVERDLOV 1996). Die zu untersuchende DNA oder mRNA, welche die differentiellen Targets beinhaltet, wird dabei als Tracer oder Tester bezeichnet und mit dem so genannten Driver, in welchem die entsprechenden Sequenzen nicht oder nur in geringerer Anzahl vorhanden sind, hybridisiert. Die Grundidee der subtraktiven Hybridisierung ist, dass die Tester-Sequenzen vorrangig mit dem im Überschuss zugesetzten Driver reassoziieren. Lediglich die Targets, für welche keine oder nur wenige komplementären Sequenzen in der Driver-Population vorhanden sind, hybridisieren zwangsläufig mit sich selbst oder verbleiben einzelsträngig. Zwei relativ neu entwickelte Techniken der subtraktiven Hybridisierung sollen in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden

2.4.2.1 Representational Difference Analysis (RDA)

Die Representational Difference Analysis (RDA) wurde für die Detektion von Unterschieden auf genomischer Ebene (LISITSYN et al. 1993) beschrieben und kurz darauf der Isolierung differentiell transkribierter Gene auf mRNA-Ebene angepasst (HUBANK u. SCHATZ 1994). Die RDA basiert auf einer selektiven Amplifikation der Tester-Sequenzen, welche neben der Anreicherung der Targets auch zu einer weitestgehenden Elimination der Driver-Sequenzen führt. Zudem erfolgt eine zusätzliche Degradierung der Sequenzen, die Tester und Driver gemeinsam besitzen.

Zur Durchführung der RDA, welche in Abb. 2 schematisch dargestellt ist, werden die zu vergleichenden Populationen zunächst mittels eines Restriktionsenzyms fragmentiert. Dieser Schritt ist auf genomischer Ebene zur Reduktion der Komplexität sowie der Herstellung effi-

zient amplifizierbarer Templates im Längenbereich von 150 bp bis 1000 bp unbedingt erforderlich. Durch die Spaltung der DNA mit einem „*six-cutter*“ Restriktionsenzym entstehen die so genannten „*representations*“, welche ungefähr 2-15 % des Genoms ausmachen (LISITSYN et al. 1993; LISITSYN 1995). Im Gegensatz dazu leitet sich eine mRNA-Population von ungefähr 15 000 Genen ab und repräsentiert somit nur 1-2 % des Genoms (ALBERT et al. 1994), eine Reduktion der Komplexität ist daher bei cDNA-Templates unnötig. Bei dieser Applikation dient der Verdau mit einem „*four-cutter*“ der Bereitstellung mindestens eines amplifizierbaren Fragments jeder cDNA-Spezies und einer insgesamten Maximierung der „*representations*“ (HUBANK u. SCHATZ 1994; DIATCHENKO et al. 1996; HUBANK u. SCHATZ 1999). An die fragmentierten cDNA-Populationen wird ein Adapter ligiert, welcher aus einem 24 bp langen Oligonukleotid besteht. Dem Reaktionsansatz wird ein weiteres zur Schnittstelle komplementäres 12 bp langes Oligonukleotid hinzugefügt, welches die Ligationseffizienz steigern soll. Da die beiden Oligonukleotide nicht phosphoryliert sind, wird nur das 24 bp lange Oligonukleotid an das 5´-Ende der cDNA-Fragmente ligiert, welches auch in der folgenden PCR als Primer dient. Die im Zuge der PCR generierten repräsentativen Amplikons werden zur Entfernung der Adapter einem nochmaligen Restriktionsenzymverdau unterzogen. Um eine selektive Amplifikation der differentiellen Transkripte in einer weiteren PCR zu ermöglichen, erfolgt die Ligation eines neuen Adapters nur bei der Tester-Population.

In der sich anschließenden Hybridisierung, in der das Driver/Tester-Verhältnis 100:1 beträgt, können drei verschiedene Hybridmoleküle gebildet werden. Am häufigsten sind Driver/Driver-Hybridmoleküle, welche keine Adapter besitzen. Daher können bei diesen Moleküle während des Auffüllens der Enden keine Primerbindungsstellen generiert werden, eine Amplifikation dieser Driver-Sequenzen in der nachfolgenden PCR ist somit ausgeschlossen. Das nächsthäufige Produkt stellen Driver/Tester-Hybride dar. Durch das Verhältnis der eingesetzten cDNA-Mengen hybridisieren nicht differentielle Tester-Sequenzen hundertmal wahrscheinlicher mit dem Driver als mit sich selbst. Diese gemeinsamen Sequenzen werden daher in erster Linie linear amplifiziert. Nur die Tester-Sequenzen, welche Tester/Tester-Hybride bilden, besitzen Primerbindungsstellen an beiden Enden und unterliegen einer exponentiellen Amplifikation. Das entstandene PCR-Produkt wird mit Mungobohnennuklease verdaut, um vorhandene einzelsträngige cDNAs, wie sie z.B. bei der linearen Amplifikation entstehen, zu entfernen. Damit erfolgt eine weitere Anreicherung der Target-Sequenzen im Reaktionsan-

satz. In diesem werden wiederum die Adapter abgespalten und neue ligiert, gefolgt von subtraktiver Hybridisierung mit erhöhter Stringenz und selektiver Amplifikation. Nach nochmaliger Wiederholung dieser Prozedur liegt schließlich ein drittes Differenzprodukt für die Erstellung der subtrahierten cDNA-Bank vor.

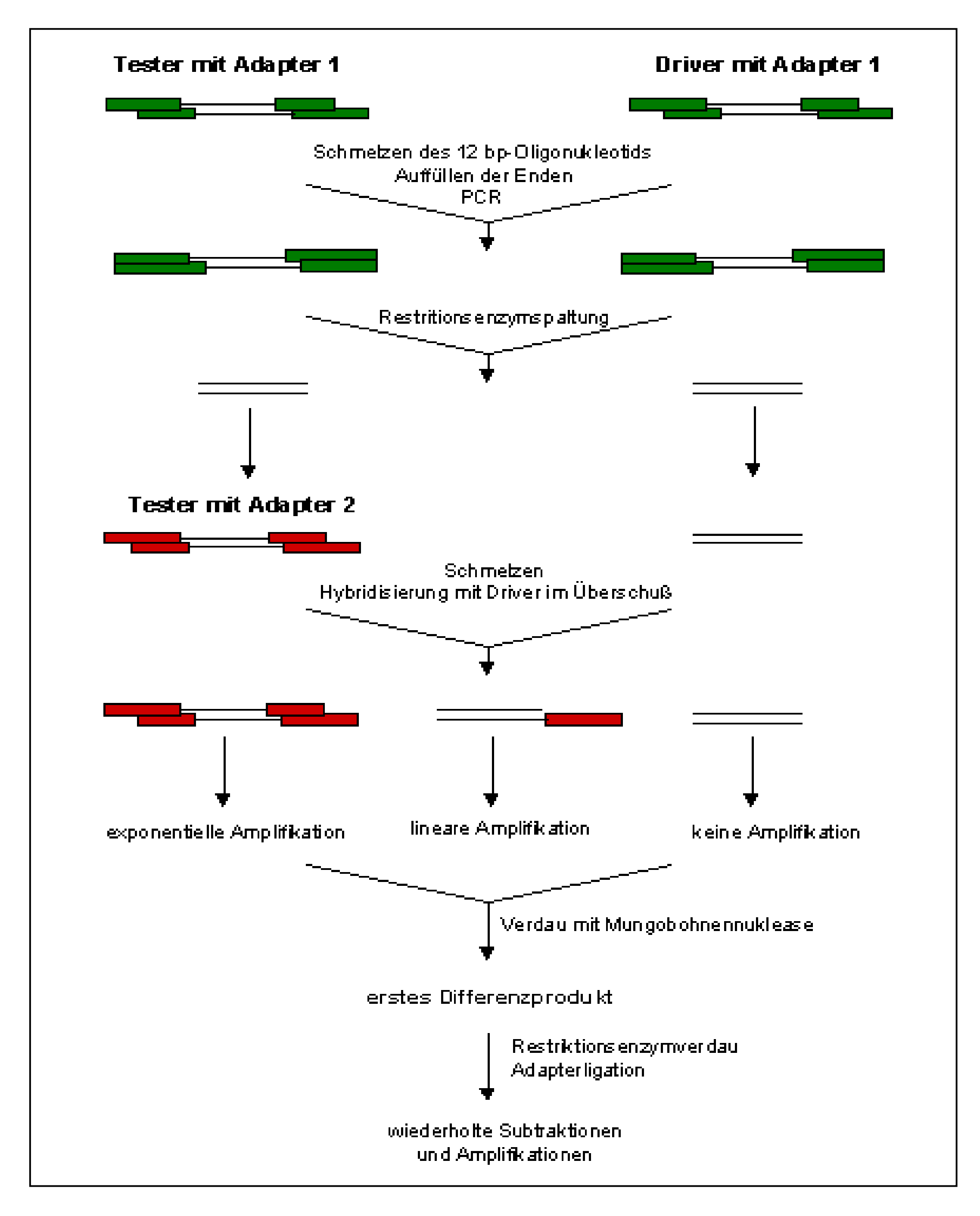


Abb. 2: Schema der Representational Difference Analysis

2.4.2.2 Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

Die Suppression Subtractive Hybridization (SSH) (DIATCHENKO et al. 1996) erreicht einen Konzentrationsausgleich der verschiedenen cDNAs und kann durch diese Normalisierung auch seltene differentiell transkribierte Sequenzen effizient anreichern. Die SSH trägt somit dem Umstand Rechnung, dass ca. 90 % der mRNA-Spezies in nur 15 bis 20 Kopien pro Zelle vorliegen und damit durchschnittlich lediglich 0,004 % der gesamten mRNA-Population einer Zelle repräsentieren (BERTIOLI et al. 1995). DIATCHENKO et al. (1996) stellten bei cDNA-Proben, denen 0,1 % sowie 0,01 % und 0,001 % virale DNA-Fragmente zugesetzt wurden, eine 100-, 1000- und 5000fache Anreicherung dieser Fragmente fest.

Wie auch bei der RDA werden die zu vergleichenden cDNA-Populationen zunächst mit einem Restriktionsenzym gespalten, woran sich eine Adapterligation anschließt. Diese erfolgt allerdings nur bei der Tester-Population, welche zu diesem Zweck in zwei Portionen unterteilt und mit zwei unterschiedlichen Adaptern ligiert wird, so dass zwei Tester-Subpopulationen resultieren. Es folgen zwei Hybridisierungsschritte. Bei der ersten Hybridisierung werden die zwei Tester-Subpopulationen in getrennten Ansätzen mit einem Überschuss an Driver versetzt und denaturiert, gefolgt von der Reassoziation der Moleküle. Die einzelsträngigen cDNAs (Molekül a in Abb. 3) der Tester-Subpopulationen repräsentieren die normalisierte Target-Fraktion. Dieser Konzentrationsausgleich zwischen häufigen und seltenen Targets erfolgt, beruhend auf der Hybridisierungskinetik, durch das schnellere Reannealing von häufigen Transkripten, welche Homohybride (b) bilden. cDNAs, welche Tester und Driver gemeinsam besitzen, bilden auf Grund des Driver-Überschusses Heterohydride (c) aus. In der zweiten Hybridisierung werden die Ansätze der ersten Hybridisierung ohne Denaturierung vermischt. Somit können nur die normalisierten, einzelsträngigen Sequenzen untereinander sowie mit dem erneut zugesetzten, denaturierten Driver hybridisieren. Aus den normalisierten Targets entsteht hierbei eine neues Hybridmolekül (e), welches unterschiedliche Adapter an den 5´-Enden besitzt. In den folgenden PCRs findet auf Grund des Suppressionseffekts (SIEBERT et al. 1995) nur eine exponentielle Amplifikation der normalisierten Moleküle vom Typ (e) statt. Typ (b) Moleküle besitzen an ihren Enden lange *inverted repeats*, welche loop-Strukturen ausbilden. Dieses intramolekulare Annealing ist stabiler als die Bindung des kürzeren Primers, was eine Amplifikation der entsprechenden Moleküle weitgehend unterbindet

(s. Abb. 8). Eine zweite, als Nested PCR durchgeführte Amplifikation trägt zur weiteren selektiven Anreicherung der normalisierten Transkripte bei. Es folgt die Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken.

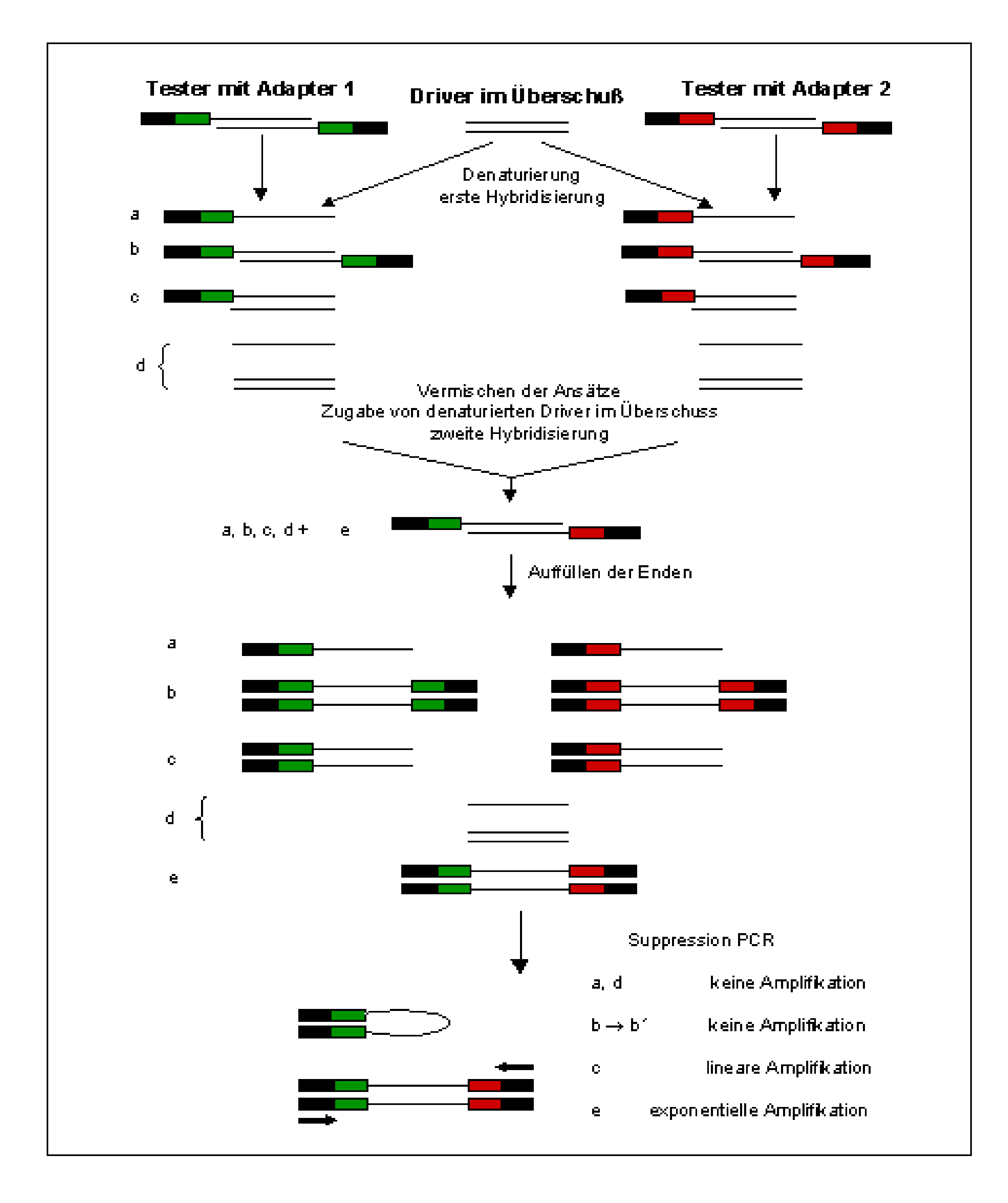


Abb. 3: Schema der Suppression Subtractive Hybridization

2.4.2.3 Vorzüge und Limitierungen der subtraktiven Hybridisierungsverfahren

Moderne subtraktive Hybridisierungsverfahren sind einfach durchführbar und reichern durch selektive Amplifikation der Tester-Sequenzen die differentiell transkribierten Targets an. Für die RDA beschreibt MYERS (1993) eine 10^5- bis 10^6-fache Anreicherung dieser Transkripte. Bei dieser Technik bestehen jedoch, wie auch bei anderen Verfahren, Konzentrationsunterschiede der individuellen mRNA-Spezies, als deren Folge sehr seltene Transkripte oftmals nicht detektiert werden. Die SSH löst dieses Problem durch einen Hybridisierungsschritt, welcher die Sequenzhäufigkeiten basierend auf der Hybridisierungskinetik normalisiert (DIATCHENKO et al. 1996). Dieser Konzentrationsausgleich in Verbindung mit der Suppression PCR verhindert auch die vorrangige Amplifikation von Sequenzen, welche große Unterschiede bezüglich der Transkriptionsrate aufweisen, wie sie IWAMA et al. (1998) bei der RDA beobachteten. Die Detektion differentiell transkribierter Gene im Hinblick auf Aktivierung und Repression wird durch eine reverse Subtraktion, bei welcher der Tester zum Driver wird und umgekehrt, möglich (DIATCHENKO et al. 1999). Zu bedenken ist jedoch, dass sich damit die benötigte Menge an Ausgangsmaterial erhöht. Diese beträgt für die SSH ein bis vier Mikrogramm mRNA (DIATCHENKO et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1999). Ist diese Menge nicht verfügbar, können Tester und Driver durch zusätzliche Adapterligation vor Beginn des SSH-Protokolls amplifiziert werden (GURSKAYA et al. 1996). Diese wie auch die Präamplifikation von Gesamt-RNA führt aber zu einem Hintergrund in den finalen PCR-Produkten (DIATCHENKO et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1999). Weiterhin vermuten die Autoren, dass durch diesen Schritt einige Sequenzen verloren gehen könnten. Die Amplifikation von Gesamt-RNA bietet andererseits den Vorteil, auch nicht poly-adenylierte Transkripte detektieren zu können (HUBANK u. SCHATZ 1994; HUBANK u. SCHATZ 1999).

Im Vergleich mit den Fingerprinting-Verfahren ist der Anteil falsch positiver Klone bei der RDA respektive SSH wesentlich geringer. HARRIS et al. (1998) ermittelten für das Differential Display eine Rate an falsch positiven Klonen von 93 % im Gegensatz zu 30 % bei der RDA und 0 % bei der SSH, wobei mit letzterer nur eine differentiell transkribierte Sequenz detektiert werden konnte. Ähnliche Ergebnisse stellten auch andere Autoren für die genannten subtraktiven Hybridisierungsverfahren fest (DIATCHENKO et al. 1996; von STEIN et al. 1997; WELFORD et al. 1998); (KUANG et al. 1998). BREITENBACH et al. (2001) und

CHAN et al. (2002) hingegen konnten mit der SSH weniger als 10 % der Klone als differentiell transkribiert verifizieren. Dieser hohe Prozentsatz falsch positiver Klone beruht nach YOKOTA et al. (2001) auf den vielen zu durchlaufenden PCR-Zyklen. Um die Zahl falsch positiver Klone zu minimieren, wurde für die SSH die Technik der „*mirror orientation selection*“ entwickelt (REBRIKOV et al. 2000). Für eine hohe Anzahl falsch positiver Klone bei der RDA machen HUBANK u. SCHATZ (1999) eine ungenügende Stringenz verantwortlich. Mit erhöhter Stringenz gehen jedoch im Zuge der wiederholten subtraktiven Hybridisierung einige differentielle Transkripte verloren (IWAMA et al. 1998). Ferner bedingen auch illegitime Sequenzfusionen sowie die Ligation partiell degradierter Oligonukleotide die oft recht hohe Zahl falsch positiver RDA-Klone (O'NEILL u. SINCLAIR 1997; HANSEN-HAGGE et al. 2001). IWAMA et al. (1998) vermuten als weitere Ursache Qualitätsunterschiede der cDNA respektive der Amplikons. Diese Autoren beobachteten auch eine Tendenz der RDA, vorrangig kleine Fragmente der cDNAs zu isolieren. Ebenso besaßen zunächst die Inserts der mit den SSH-Produkten erstellten subtrahierten cDNA-Banken nur eine durchschnittlichen Länge von 200 bp, da kürzere Fragmente effizienter hybridisieren sowie amplifiziert und in Vektoren ligiert werden (DIATCHENKO et al. 1999). Die Autoren entwickelten daher Adapter, die im Gegensatz zu denen des Originalprotokolls (DIATCHENKO et al. 1996) an den 5`-Enden 22 identische Nukleotide aufwiesen. Auch Moleküle mit unterschiedlichen Adaptern an den Enden besitzen nun kurze *inverted repeats*. Der resultierende Suppressionseffekt wird aber nur bei sehr kurzen cDNAs offensichtlich, da hier effizienter loop-Strukturen gebildet werden, was eine vermehrte Amplifikation längerer Fragmente bedingt. Durch die Adaptermodifikation ist zudem in der ersten PCR nur noch ein Primer nötig und damit auch das Problem der Primerdimere umgangen (LUKYANOV et al. 1995).

Eine wesentliche Limitierung der subtraktiven Hybridisierungsverfahren ist die Beschränkung auf den Vergleich zweier Populationen. Durch die Verwendung eines Restriktionsenzyms, welches „*sticky ends*“ hinterlässt und darauf abgestimmte Adapter können mit der RDA keine Fragmente von den Enden der Transkripte oder solche ohne entsprechende Schnittstelle detektiert werden (HUBANK u. SCHATZ 1994; HUBANK u. SCHATZ 1999). Ferner sind bei der RDA und SSH die Qualität der RNA und synthetisierten cDNA, die Einhaltung der richtigen Konzentrationsverhältnisse und das Gelingen der einzelnen Reaktionsschritte von großer

Bedeutung für den Erfolg der Methoden (HUBANK u. SCHATZ 1994; IWAMA et al. 1998; von STEIN 2001).

3 Material und Methoden

3.1 Puffer und Lösungen

6x Ladungspuffer:	0,25 % Bromphenolblau; 40 % Saccharose, in Aqua bidest.
GTC/ME-Puffer:	4 M Guanidinium-Thiocyanat; 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 1 % β-Mercapto-Ethanol
DEPC-Bidest:	0,1 % Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest., 12 Stunden bei 37 °C rühren, anschließend 15 min bei 100°C
20x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7
SDS-Puffer:	10 % SDS in Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert durch 0,2 µm Einweg-Filterhalter
2x Waschlösung:	2x SSC; 0,1 % SDS
0,5x Waschlösung:	0,5x SSC; 0,1 % SDS
1x TAE:	40 mM Tris-Acetat pH 8; 2 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA
1x TNE:	10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA

Für alle Lösungen und Puffer wurde Aqua bidest. verwendet. Alle Lösungen und Puffer wurden, soweit möglich, autoklaviert oder aus autoklavierten Stammlösungen hergestellt.

3.2 Medien und Platten

LB-Medium:	1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7
LB-Agarplatten:	LB-Medium mit 15 g Agar/l

Sämtliche Lösungen wurden autoklaviert. Als Antibiotikum wurde Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml Medium bzw. Agar verwendet.

3.3 Reagenzien, Enzyme, Reaktionsgefäße, Reaktionskits und Geräte

AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Autoradiography Cassette RPN 1645 35 x 43 cm; KODAK BioMax™ Light Film 24x30 cm; Spektralphotometer Gene Quant pro; Hoefer HE 33 Mini Submarine Unit; Quick Prep™ Micro mRNA Purification Kit

ANGEWANDTE GENTECHNOLOGISCHE SYSTEME, Heidelberg
Horizontal Mini-Gel Electrophoresis System

APPLIED BIOSYSTEMS, Warrington, UK
TaqMan™-Sonden sowie TaqMan™-Minor Groove Binder-Sonden und Primer

BIOMETRA, Göttingen
Personal Cycler; Agagel Midi-Wide Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus; Standard Power Pack P25

BIOZYM, Hessisch Oldendorf
MJ Research Multicycler PTC 200; Gel Star™

BD CLONTECH, Heidelberg
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit; SMART™ RACE cDNA Amplification Kit; CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit; CLONTECH PCR-Select™ Differential Screening Kit; CHROMA SPIN™-100 DEPC-H_2O Columns; CHROMA SPIN™-1000 DEPC-H_2O Columns; Advantage™ 2 Polymerase Mix; Advantage™ 2 PCR Kit;

EPPENDORF, Hamburg
Thermomixer 5436; Thermomixer comfort

FRESENIUS, Bad Homburg

Ampuwa™

GFL, Burgwedel

Wärmeschrank 3033; Wasserbad 1083

HERAEUS, Osterode

Wärmeschrank BT 5042 E; Wärmeschrank TU 60/60; Biofuge Pico; Biofuge 13; Omnifuge 2.ORS

HYBAID, Heidelberg

Hybaid Midi Gel Horizontal Electrophoresis System

IBI, New York, USA

MBP 300, 300 V Power Supply

INTAS, Göttingen

UV-Tisch TF-M 20 x 40 cm, 312 nm; Video-Geldokumentations-Anlage

INTEGRA, Fernwald

KODAK GBX Developer; KODAK GBX Replenisher

INVITROGEN, Karlsruhe

TOPO TA Cloning™ Kit for Sequencing; 250 bp DNA Ladder; Low DNA MASS™ Ladder; Primer

JOUAN, Unterhaching

Zentrifuge BR4i

GIBCO BRL/LIFE TECHNOLOGIES, Eggenstein

*Eco*RI; *Taq* DNA-Polymerase

MACHEREY & NAGEL, Düren

NucleoSpin™ Plasmid; NucleoSpin™ Tissue; Nucleobond™ AX –100

MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

MEMMERT, Schwabach

Wärmeschrank ULE 800

PERKIN ELMER, Jügesheim

AmpliTaq Gold™ Polymerase; GeneAmp™ 10x PCR Buffer II

PROMEGA, Mannheim

Wizard™ PCR Preps DNA Purification System; RNasin™ Ribonuclease Inhibitor; Desoxy NTP Set

QIAGEN, Hilden

QIAGEN Plasmid Midi Kit

QIAGEN OPERON, Köln

TaqMan™-Sonden und Primer

RENNER, Dannstadt

Microcomputer Elektrophoresis Power Supply; Parafilm™; 45 µm-Einweg-Filterhalter

RETSCH, Haan

Analysesieb 200 x 50 mm, Maschenweite 50 µm

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II; DIG Wash and Block Buffer Set; DIG Easy Hyb; DIG DNA Labeling Mix; positiv geladene Nylonmembranen 20x30 cm; Hybridization Bags; mRNA Isolation Kit; Glykogen; *Rsa*I, *Sma*I, *Eae*I

ROTH, Karlsruhe

Agarose NEEO Ultra Qualität Rotiagarose™

SARTORIUS, Göttingen
Elektronische Präzisionswaage L610D

STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
MX 4000™ Multiplex Quantitative PCR System; Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit

ZEISS, Jena
Stereomikroskop (47 30 11-9901), Mikrometerokular, Objektmikrometer

Alle weiteren, nicht einzeln aufgeführten Produkte wurden von den Firmen Hans Landgraf, Langenhagen; Merck, Darmstadt; SIGMA-Aldrich, Deisenhofen; Sarstedt, Nümbrecht; Stratagene, Amsterdam, Niederlande und Carl Roth, Karlsruhe erworben. Als Pipetten dienten Eppendorf Research 10, 100, 1000 und 5000 der Firma EPPENDORF, Hamburg, sowie die Mehrkanalpipette Matrix Impact2™ der Firma APOGENT DISCOVERIES, Wehrheim. Als Reaktionsgefäße wurden 0,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäße der Firma EPPENDORF, Hamburg, 1,5 ml und 2 ml Gefäße sowie 0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml DEPC-Gefäße der Firma BIOZYM, Hessisch Oldendorf; 11 ml Gefäße der Firma NUNC, Wiesbaden und 50 ml Gefäße der Firma RENNER, Dannstadt verwendet. In der quantitativen real-time PCR wurden als Reaktionsgefäße 8x strip tubes im 0,2 ml-Format sowie optische Deckel (8x strip optical cap) der Firma STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande, genutzt. Für die PCR wurden Sterilfiltertips der Firma BIOZYM, Hessisch Oldendorf sowie oberflächenoptimierte Sterilfiltertips der Firma NERBE PLUS, Winsen genutzt. Alle Amplifikationsreaktionen liefen, soweit nicht anders vermerkt, im MJ Research Multicycler PTC 200 (BIOZYM) ab.

3.4 Bakterien und Vektoren

Escherichia coli One Shot™ TOP10 — F^{-} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^{R}) *end*A1 *nup*G

pCR™ 4-TOPO™

3.5 Versuchsplan

Zunächst sollte versucht werden, mit Hilfe sequenzspezifischer Primerpaare für Gene, die bei dem ebenfalls zur Entwicklungshemmung befähigten Erdnematoden *Caenorhabditis elegans* in diesen Prozess involviert sind, eventuelle Sequenzhomologe bei *Dictyocaulus viviparus* zu identifizieren. Dies erfolgte mittels Amplifikation genomischer DNA adulter Lungenwürmer mit anschließender Klonierung, Sequenzierung und Sequenzidentitätsvergleich. Des Weiteren wurde zur Identifikation differentiell transkribierter Gene bei Hypobiose induzierten (L3i) und nicht induzierten (L3ni) dritten Lungenwurmlarven die Suppression Subtractive Hybridization (SSH) mit nachfolgendem Differential Screening der erstellten subtraktiven cDNA-Banken angewandt. Anschließend erfolgte die Bestätigung einer differentiellen Transkription mittels cDNA dot blot. Diese verifizierten Genfragmente wurden kloniert, sequenziert und mit bereits veröffentlichten Sequenzen anderer Organismen verglichen, wobei cDNA-Sequenzen, die signifikante Identitäten aufwiesen, einer weiteren Charakterisierung unterlagen. Hierzu wurden die Fragmente mittels der 3´- und 5´ Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) komplettiert und nach erneuter Klonierung und Sequenzierung wiederum einem Sequenzidentitätsvergleich unterzogen. Abschließend wurde jeweils ein differentiell transkribiertes Gen der Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten Larven ausgewählt, um dessen Transkriptionsrate in den beiden Larvenpopulationen mit Hilfe der quantitativen real-time PCR zu ermitteln.

3.6 Parasitologisches Probenmaterial und dessen Aufbereitung

3.6.1 Etablierung eines Laborstammes

Um ausreichende Mengen an parasitologischen Probenmaterial zu sichern, wurde zu Beginn der Arbeit ein *D. viviparus*-Laborstamm etabliert. Zu diesem Zweck wurde ein Kalb mit einer natürlich erworbenen Lungenwurminfektion gekauft. Dieses Feldisolat diente als Ausgangsmaterial für die folgenden im Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover stattfindenden Passagen im Wirt.

3.6.2 Isolierung von Lungenwurmlarven aus dem Kot

Mit Hilfe des Trichter-Auswanderverfahrens (BAERMANN 1917) wurden erste unbescheidete Larven aus rektal entnommenem Kot experimentell infizierter Kälber gewonnen. Um die Verunreinigungen in der abgelassenen Larvensuspension zu reduzieren, erfolgte eine Sedimentation der Larven über Nacht in 500 ml Standzylindern. Am folgenden Tag wurde der Überstand abgenommen und ein zweites Trichter-Auswanderverfahren über Siebe mit einer Maschenweite von 50 µm, welche zusätzlich mit 3 Lagen Zellstoff ausgeschlagen wurden, angeschlossen. Die so gewonnenen Larven wurden in Leitungswasser in 200 ml Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte mittels Parafilm™ (RENNER) ein weitestgehender Verschluss der Gefäßöffnung. Nach 5 bis 10 Tagen wurden die nun als doppelt bescheidete, infektiöse dritte Entwicklungsstadien (L3) vorliegenden Larven weiterverarbeitet.

3.6.3 Induktion der Entwicklungshemmung

Zur Untersuchung der Gentranskription bei entwicklungsgehemmten dritten Lungenwurmlarven (L3i) wurde bei einem Teil der aus dem Kot isolierten Larven die Hypobiose durch sechs- bis achtwöchige Kühlung experimentell induziert (INDERBITZIN 1976). Zur Ermittlung der Überlebensrate nach dieser Behandlung wurde die Anzahl lebender Larven in der Larvensuspension vor und nach der Kühlung bestimmt. Um vor der Kühlung eine Aufreinigung der L3 zu erreichen, wurden diese in frisches Leitungswasser überführt. Zu diesem Zweck wurden die Larven in einen 250 ml Standzylinder gegeben, dieser mit Leitungswasser aufgefüllt und die Larven über Nacht sedimentiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Überstand bis auf ca. 10 ml abgenommen, die verbleibende Larvensuspension in einen 200 ml Erlenmeyerkolben überführt und auf ca. 50 ml mit Leitungswasser aufgefüllt. Zur Vermeidung von Kontaminationen der Larvensuspension wurde die Gefäßöffnung mit Parafilm™ (RENNER), welcher mit kleinen Löchern zur Sauerstoffzufuhr versehen wurde, verschlossen.

3.6.4 Überprüfung der Hypobiosefähigkeit des Laborstammes

3.6.4.1 Experimentelle Infektion

Bei insgesamt drei männlichen Kälbern im Alter von drei Monaten erfolgte zur gleichen Zeit eine orale Infektion mit den zwei zu untersuchenden Larvenpopulationen (L3i, L3ni). Kalb 1 wurde dabei an drei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 1000 nicht vorbehandelten, infektiösen dritten Larven (L3ni) oral infiziert. Bei Kalb 2 und 3 erfolgte die Infektion an zwei aufeinander folgenden Tagen mit je 10 000 infektiösen larvalen Stadien, die zuvor einer sechswöchigen Kühlung bei 4 °C (L3i) unterzogen wurden.

3.6.4.2 Isolierung von *D. viviparus*-Stadien aus der Lunge

Kalb 1 und 2 wurden am 27. Tag *post infectionem* (*p.i.*), Kalb 3 am 42 Tag *p.i.* getötet und seziert, um Luftröhre, Lunge und Herz unverletzt zu entnehmen. Bei Kalb 1 wurden Trachea und Bronchien mit einer Schere eröffnet, die Parasitenstadien mit einer Pinzette entnommen und in ein Gefäß mit Leitungswasser überführt. Im Gegensatz dazu wurde bei Kalb 2 und 3 nach Eröffnung der rechten Vorkammer ein an die Hauswasserleitung angeschlossener Schlauch (Ø 1,5 cm) in die *Arteria pulmonalis* eingeführt und äußerlich fest fixiert. Nach der Ligation der *Vena pulmonalis* wurde die Lunge mit ca. 20 l Leitungswasser perfundiert (EYSKER et al. 1990), die Spülflüssigkeit über die Luftröhre durch ein Sieb mit 50 µm Maschenweite (RETSCH) geleitet und in einem entsprechend großem Gefäß aufgefangen. Die in dem Sieb zurückgehaltenen Parasitenstadien wurden mit Leitungswasser aus dem Sieb gespült und in ein Becherglas überführt.

Die Auszählung und Bestimmung erfolgte bei den durch Lungenperfusion erhaltenen Lungenwurmstadien mittels eines Stereomikroskops (OLYMPUS) bei zehnfacher Vergrößerung, die Vermessung erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit Okularmikrometer (ZEISS), welches zuvor mit einem Objektmikrometer (ZEISS) geeicht wurde. Zudem wurden die Parasitenstadien auf eventuelle Anlagen einer Bursa copulatrix untersucht, die als Merkmal für eine Differenzierung zum männlichen Geschlecht diente.

3.6.4.3 Ermittlung der Larvenausscheidung

Am 21. Tag *post infectionem* (*p.i.*) wurde den drei Versuchskälbern rektal Kot entnommen. Von jedem Tier wurden zweimal je 10 g Kot abgewogen, um die Zahl der ausgeschiedenen Larven mittels des Trichter-Auswanderverfahrens (BAERMANN 1917) zu ermitteln. Auch am Tag der Tötung erfolgte eine rektale Kotentnahme. Von Kalb 1 und 2 wurden zweimal je 5 g Kot, von Kalb 3 zweimal je 10 g Kot abgewogen und dem Trichter-Auswanderverfahren unterzogen.

3.6.5 Entscheidung infektiöser *D. viviparus*-Larven

Das mit Natriumhypochlorid (NaOCl) zu entscheidende Larvenmaterial stellten die dritten, doppelt bescheideten, unbehandelten sowie Hypobiose induzierten Larven dar. Um einen gewissen Reinigungseffekt zu erzielen, wurden die Larven am Tag vor der Entscheidung in einen 250 ml Standzylinder gegeben und dieser mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Sedimentation der Larven fand über Nacht bei Raumtemperatur (RT) bzw. 4 °C statt. Am darauf folgenden Tag wurde der Überstand abgenommen. Nachdem die Larven mit DEPC-Bidest auf ca. 15 ml aufgefüllt wurden, erfolgte eine Auszählung der lebenden Larven. Diese wurden dann in Portionen zu jeweils 50 000 bis 100 000 L3 in 11 ml Gefäße überführt und mit DEPC-Bidest auf 5 ml aufgefüllt. Nach der Zugabe von 250 µl NaOCl (12 % Cl) fand eine 15 minütige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm (GFL) statt. Die vollständige Entscheidung der lebenden Larven wurde mikroskopisch (ZEISS) kontrolliert. Anschließend erfolgten zur Auswaschung des NaOCl drei Waschschritte, bei denen die Gefäße mit DEPC-Bidest auf 10 ml aufgefüllt und jeweils 10 Minuten bei 600 *g* zentrifugiert wurden. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand so weit wie möglich abgenommen, das Larvenpellet durch Vortexen resuspendiert und wieder auf 10 ml aufgefüllt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Larvenpellet in 500 µl GTC/ME-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml DEPC-Gefäß überführt und bei – 70 °C gelagert.

3.6.6 Degradation der Parasitenmembran

Der Aufschluss der äußeren und inneren Parasitenmembranen ist Voraussetzung für eine effiziente RNA Isolierung. Die äußere Membran wurde dabei von der Kutikula repräsentiert, da ausschließlich entscheidete Larven verwendet wurden. Die Degradation der Parasitenmembranen geschah durch Zermörsern der Larven unter flüssigem Stickstoff. Die für die mRNA-Isolierung eingesetzten 250 000 bis 520 000 L3 wurden dabei zunächst in ein 1,5 ml DEPC-Gefäß zusammengeführt und 5 Minuten bei 1500 *g* zentrifugiert. Danach wurde der überstehende GTC/ME-Puffer abgenommen um das Gewicht der eingesetzten Larvenmenge zu bestimmen (SATORIUS). Für die sich anschließende Zermörserung wurde das Larvenpellet in 70 µl DEPC-Bidest resuspendiert, in einen Mörser überführt und mit einem Pistill zerkleinert. Hierbei wurde das Larvenmaterial wiederholt mit einer sterilen Skalpellklinge zusammengekratzt, um eine effektive Zerkleinerung zu gewährleisten, welche mikroskopisch kontrolliert wurde (ZEISS). Um die Zerkleinerung zu erleichtern, wurden während der Durchführung alle verwendeten Materialien wie auch das Larvenmaterial selbst, mehrfach mit flüssigem Stickstoff übergossen. Nach der Überführung der zermörserten Larven in ein 2 ml DEPC-Gefäß wurde sofort mit der mRNA-Isolierung begonnen.

3.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.7.1 mRNA-Isolierung

Die mRNA, welche für verschiedene Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erforderlich war, wurde aus den zerkleinerten Larven mit dem Quick Prep™ Micro mRNA Purification Kit (AMERSHAM BIOSCIENCES) isoliert. Die bei fast allen eukaryontischen mRNAs am 3´-Ende vorliegende homopolymere Poly-A-Sequenz hybridisiert dabei an eine ebenfalls homopolymere Thymidin-Kette, welche kovalent an Zellulosepartikel gebunden ist. Diese Oligo(dT)-Zellulose wird im Verlauf der mRNA-Isolierung in eine Schleudersäule verbracht.

Zunächst erfolgte im Rahmen der mRNA-Isolierung ein weiterer Aufschluss des zerkleinerten Larvenmaterials (s. 3.6.6) durch Hinzufügen von Guanidinium-Thiocyanat (GTC)-haltigen Extraktionspuffer und gründlicher Durchmischung. Die anschließende Zugabe von Eluti-

onspuffer zu dem Zellhomogenat bedingte nach sorgfältiger Vermischung das Ausfällen vieler Proteine, wodurch eine initiale Reinigung stattfand. Gleichzeitig wurde dabei die GTC-Konzentration so eingestellt, dass die Bindung der Poly-A-Sequenz an die Thymidin-Kette möglich, aber die Inhibition von RNasen noch gegeben war. Nach erfolgter komplementärer Bindung der mRNA an die Oligo(dT)-Zellulose bewirkten mehrere Waschschritte mit einem Hoch- und Niedrig-Salz-Puffer das Auswaschen von DNA, restlichen Proteinen und sonstigen Zellbestandteilen. Abschließend wurde die mRNA mittels eines auf 65 °C erwärmten Elutionspuffers aus der Säule zurück gewonnen. Sämtliche Reaktionsschritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll vorgenommen.

Die Präzipitation der mRNA erfolgte durch Zugabe von 10 µl Glykogen, 40 µl Kaliumacetat und 1 ml 95 %igem Ethanol über Nacht bei – 70 °C. Am folgenden Tag wurde die gefällte mRNA durch eine 30 Minuten andauernde Zentrifugation bei 13 000 *g* und 4 °C gesammelt und der über dem Pellet befindliche Überstand abgenommen. Es schloss sich eine Waschung des Pellets zur Beseitigung von Salz- und Alkoholresten mit 1 ml 70 %igem Ethanol an. Hierbei erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 13 000 *g*. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet zur Entfernung restlichen Ethanols ca. 10 Minuten bei RT getrocknet und danach, abhängig von der sich anschließenden Untersuchung, in 5 bis 8 µl DEPC-Bidest gelöst.

3.7.2 Quantitative Bestimmung und Reinheit der isolierten mRNA

Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einem Spektralphotometer (AMERSHAM BIOSCIENCES) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA (SAMBROOK et al. 1989). Der Reinheitsgrad errechnet sich aus dem Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} und beträgt bei einer reinen RNA-Lösung 2. Die mRNA wurde zur photometrischen Konzentrationsmessung bei der Verwendung von Quarzküvetten 10fach, bei Plastik-Einwegküvetten 50fach mit DEPC-Bidest verdünnt. Nach der quantitativen Bestimmung wurde der mRNA 1 µl (40 U) RNasin™ Ribonuclease Inhibitor (PROMEGA) zugefügt, um eine Degradierung der mRNA zu vermeiden und sofort mit der Erststrang-cDNA-Synthese begonnen.

3.7.3 cDNA-Synthese

3.7.3.1 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA-Synthese beruht auf der Fähigkeit der Reversen Transkriptase, mRNA in einzelsträngige DNA umzuschreiben. Als Primer dient bei dieser Reaktion ein Oligo(dT)-Primer, der selektiv an die Poly-A-Sequenz am 3´-Ende der mRNAs hybridisiert. Liegen sehr lange mRNA-Sequenzen oder solche mit Sekundärstrukturen vor, wird in der reversen Transkription oftmals nicht die gesamte Sequenz umgeschrieben, die Erststrang-cDNA-Synthese bricht vor dem 5`-Ende auch nicht degradierter mRNAs ab.

Um möglichst viele cDNAs in voller Länge zu erhalten, wurde für die Durchführung der unter Kapitel 3.8 beschriebenen Suppression Subtractive Hybrization und die Herstellung der Sonden zur Verifizierung der differentiell transkribierten Gensequenzen (s. 3.11.2) der SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD CLONTECH) eingesetzt. Die SMART™-Methode (Switching Mechanism At 5´ end of RNA Template) beruht auf der Terminalen Transferase Aktivität der verwendeten *Moloney murine leukemia virus* (MMLV) reversen Transkriptase (RT), die zusätzlich eine RNase H^- Punktmutation aufweist. Erreicht das Enzym das 5´-Ende der mRNA, hängt es an das 3´-Ende der synthetisierten cDNA einige zusätzliche Nukleotide, vorwiegend Desoxycytidin, an. Dieses Oligo(dC)-Tailing ermöglicht dem SMART™ II Oligonukleotid, welches am 3´-Ende eine Oligo(dG)-Sequenz besitzt, die Hybridisierung. Daraufhin wechselt die Reverse Transkriptase das Template und verlängert die synthetisierte cDNA um die zum SMART™ II Oligonukleotid komplementären Basen (s. Abb. 4). Bricht die cDNA-Synthese vor Erreichen des 5´-mRNA-Endes ab, ist die Terminale Transferase Aktivität des Enzyms sehr viel geringer. Somit erfolgt das Template Switching der Reversen Transkriptase meist nur dann, wenn die cDNA-mRNA-Hybriden in voller Länge vorliegen.

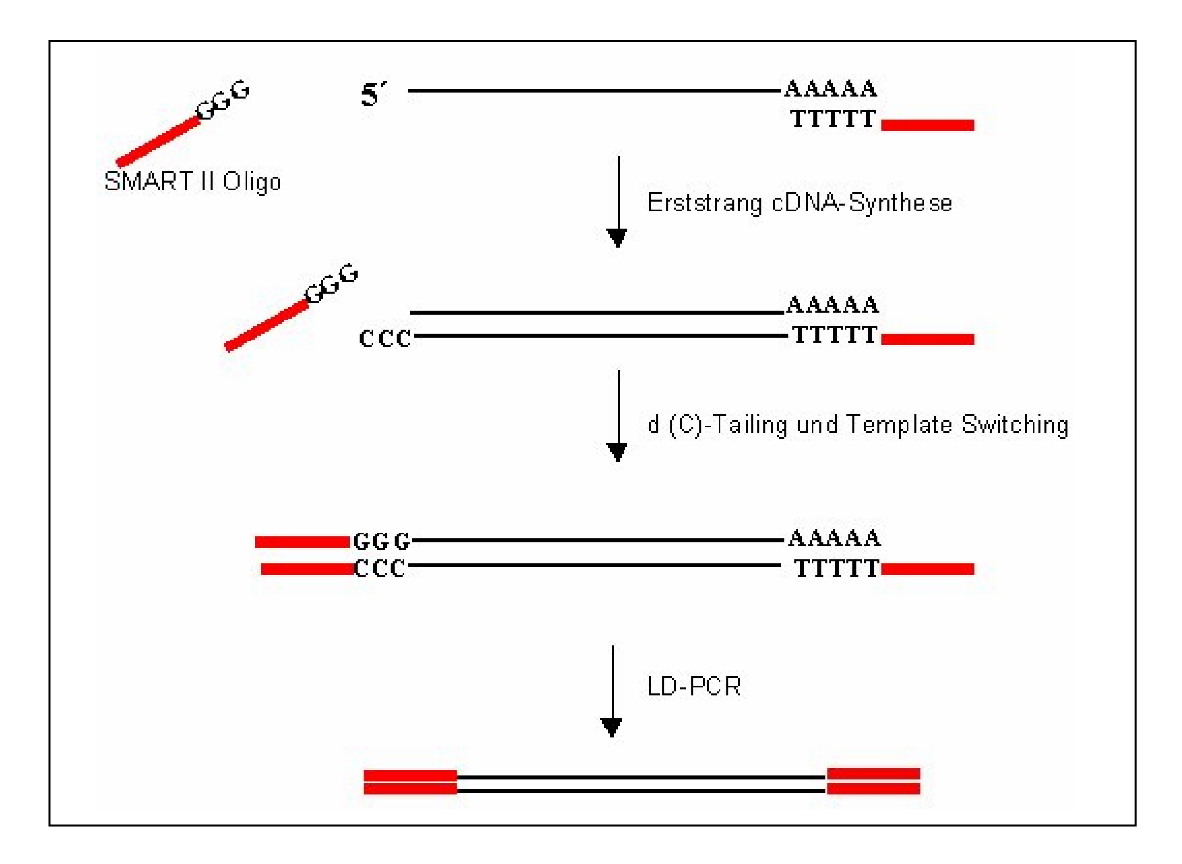


Abb. 4: Erststrang-cDNA-Synthese und Long Distance (LD) PCR

Bei dem in der Erststrang-cDNA-Synthese als Primer verwendeten cDNA Synthesis (CDS) Primer handelt es sich um einen Oligo(dT)-Primer, der am 5´-Ende eine Ankersequenz besitzt, die der des SMART™ II Oligonukleotid entspricht. Die in der cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

CDS Primer: 5´-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT$_{(30)}$N$_{-1}$N-3´
*Rsa*I
(N = A, C, G oder T; N$_{-1}$ = A, C oder G)

PCR Primer: 5´-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3´

SMART™ II Oligonukleotid: 5´-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3´
*Rsa*I

Abb. 5: In der cDNA Synthese verwendete Oligonukleotide (BD CLONTECH)

3.7.3.2 Zweitstrang-cDNA-Synthese mittels Long Distance (LD) PCR

Um ausreichende Mengen an cDNA für die spätere subtraktive Hybridisierung zu erhalten, erfolgte im nächsten Schritt neben der Zweitstrang-cDNA-Synthese auch eine cDNA-Amplifikation durch eine Long Distance (LD) PCR, welche mit den Reagenzien des Advantage™ 2 PCR Kit (BD CLONTECH) durchgeführt wurde. Der hierin enthaltene Advantage™ 2 Polymerase Mix, welcher, soweit nicht anders vermerkt, bei allen im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Amplifikationen eingesetzt wurde, enthält neben einer nukleasedefizienten *Taq* DNA Polymerase-Mutante, der so genannten TITANIUM™ *Taq* DNA Polymerase und dem TaqStart™-Antikörper für eine automatische *hot-start* PCR, noch eine *proofreading* Polymerase. Diese Kombination ermöglicht die Amplifikation langer cDNA-Sequenzen mit hoher Ausbeute bei gleichzeitig verminderter Fehlerrate. Die zur Ankersequenz des CDS Primers und SMART™ II Oligonukleotids komplementären Basen dienen als Zielsequenz für den PCR Primer (s. Abb. 5). Somit erfolgt eine exponentielle Amplifikation nur bei cDNAs voller Länge, da bei unvollständiger reverser Transkription nur eine Bindungsstelle für den PCR Primer vorhanden ist.

3.7.3.3 Bestimmung der optimalen Anzahl an LD PCR-Zyklen

Wird die Ausbeute an PCR-Produkt nicht mit weiteren Zyklen erhöht, hat die PCR ein Plateau erreicht. Erfolgen mehr Zyklen als es zum Erreichen des Plateaus erforderlich wäre, vermindert sich die Qualität der synthetisierten cDNA. Mittels Gelelektrophorese wurde die Anzahl der Zyklen, mit der cDNA in ausreichender Menge und guten Template-Eigenschaften für später durchzuführende Schritte gewonnen werden kann, bestimmt. Dabei wurde der Zyklus, vor dem die Plateauphase erreicht wurde, als die optimale PCR-Zyklenzahl definiert.

Zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahl wurde neben den für das eigentliche Experiment benötigten Reaktionsansätzen ein weiterer als Testansatz in der LD PCR amplifiziert. Nach 15 erfolgten PCR-Zyklen mit dem unten dargestellten Temperaturprofil wurden die für den weiteren Verlauf erforderlichen Proben bei 4 °C aufbewahrt. Von den verbleibenden Testansätzen der L3ni und L3i wurden 15 µl zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für die spätere Gelelektrophorese abgenommen und diese wieder in den Thermocycler verbracht. Nach-

dem die Testansätze drei weitere der unten aufgeführten PCR-Zyklen durchlaufen hatten, wurden wiederum 15 µl abgenommen und dieses Vorgehen noch zweimal wiederholt. Von den 15 µl-Aliquots der 15, 18, 21 und 24 durchlaufenen Zyklen wurden jeweils 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

	initiale Denaturierung	95 °C, 1 Minute
15 bzw. 3x	Denaturierung	95 °C, 15 Sekunden
	Primerannealing	65 °C, 30 Sekunden
	Primerextension	68 °C, 6 Minuten

3.7.4 Primerdesign

Um die gewünschte Amplifikation zu erzielen, sollten die Oligonukleotide, welche der Polymerase als Primer dienen, bestimmten Anforderungen genügen. Die Primerlänge beträgt im Regelfall 18 bis 24 Nukleotide bei einem Guanosin (G)/Cytosin (C)-Gehalt von 40 % bis 60 %. Am 3´-Ende der Primer sollten ein oder zwei G bzw. C platziert sein, um eine bessere Bindung zu gewährleisten. Befinden sich dort jedoch mehr als drei G oder C, werden fehlhybridisierende Primer stabilisiert. Um diese Fehlhybridisierungen zu vermeiden, sollten Primer auch nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten. Ferner ist darauf zu achten, dass Vorwärts- und Rückwärtsprimer keine komplementären Sequenzen, insbesondere am 3´-Ende, aufweisen, da sonst Primerdimere entstehen. Auch sollte ein Primer nicht selbstkomplementär sein und somit interne Sekundärstrukturen ausbilden. Im Idealfall weisen Vorwärts- und Rückwärtsprimer den gleichen Schmelzpunkt auf, welcher nach folgender Formel errechnet werden kann:

$$T_M = N \times [GC] \times 4 + N \times [AT] \times 2$$

Abb. 6: Formel zur Errechnung der Schmelztemperatur (T_M) von Oligonukleotiden (N = Anzahl der Basenpaare) (THEIN u. WALLACE 1986)

In dieser Arbeit erfolgte das Design der genspezifischen Primer für die konventionelle PCR mit Hilfe des Softwareprogramms Lasergene (DNASTAR, Version 5.06), die ausgewählten und auf die oben beschriebenen Anforderungen überprüften Primer wurden von der Firma INVITROGEN synthetisiert.

3.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (SAIKI et al. 1988) können *in vitro* spezifische Nukleinsäuresequenzen vervielfältigt werden. Im ersten Reaktionsschritt unterliegt die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen einer Denaturierung, so dass im nachfolgenden Schritt zwei die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankierende Primer an den für sie komplementären Bereichen an die Einzelstränge binden können (Annealing). Eine thermostabile Polymerase synthetisiert im dritten Reaktionsschritt die zum jeweiligen Einzelstrang komplementäre DNA-Kopie (Extension). Diese drei Reaktionsschritte laufen in einer Anzahl von Zyklen hintereinander ab und bedingen so die Amplifikation der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. Zur Kontrolle des korrekten Ablaufs der PCR in den Thermocyclern (BIOMETRA, BIOZYM) kamen Negativ- sowie teilweise Positivkontrollen zum Einsatz.

3.7.6 Darstellung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden zur Kontrolle von Amplifikationsprodukten, Restriktionsenzymspaltungen sowie Aufreinigungen genutzt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose (Agarose NEEO Ultra Qualität Rotiagarose™, ROTH) in einer Konzentration von 1 bis 2 % in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 52 °C wurde der Farbstoff GelStar™ (BIOZYM) als 10 000fache Verdünnung der Stammlösung zu der flüssigen Agarose gegeben und nachfolgend das Gel gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden entsprechend ihrem Volumen mit der benötigten Menge an 6x Ladungspuffer zur Erhöhung der Dichte versetzt und neben einem Längenstandard in die Geltaschen eingebracht. Über einen Stromgeber (BIOMETRA, RENNER, IBI) wurden, je nach Größe und Konzentration der Gele, 85 bis 110 Volt für 45 bis 80 Minuten angelegt. Der Farbstoff GelStar™ interkalierte wäh-

rend der Elektrophorese in die DNA, welche dann unter UV-Licht (312 nm) aufgrund der erzeugten Fluoreszenz sichtbar gemacht und mit einer Videodokumentationsanlage (INTAS) fotografisch festgehalten wurde.

3.7.7 Isolierung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von Amplifikationsprodukten aus Agarosegelen wurde das Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (PROMEGA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die relevante Bande wurde unter UV-Kontrolle mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten, die DNA mittels einer Schleudersäule von der Agarose getrennt und anschließend in 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. eluiert.

3.7.8 Klonierung von PCR-Amplifikaten

3.7.8.1 Klonierungsvektor

Die *Taq* DNA-Polymerase besitzt eine nicht Template-abhängige Terminale Transferase Aktivität, durch welche an beide 3´-Enden des Amplifikationsprodukts ein Desoxyadenosin angefügt wird. An den 3´-Enden des zur Klonierung verwendeten Plasmidvektors pCR™ 4-TOPO™ aus dem TOPO TA Cloning™ Kit for Sequencing (INVITROGEN) hingegen befindet sich ein Desoxythymidinrest, wodurch eine effiziente Klonierung erreicht wird. Ebenfalls an den 3´-Enden des Vektors ist die Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus lokalisiert. Diese bindet doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen und spaltet in einem DNA-Strang das Phosphodiester-Rückgrat nach der Sequenz 5´-CCCTT (SHUMAN 1991). Die dabei frei werdende Energie wird in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3´-Ende des geschnittenen Stranges und einem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I gespeichert. Diese Phospho-Tyrosyl-Bindung kann wiederum von der 5´-OH-Gruppe des zertrennten Stranges angegriffen werden, wodurch die Spaltungsreaktion rückgängig gemacht und die Topoisomerase I freigesetzt wird (SHUMAN 1994). Bei der Klonierung von PCR-Produkten in den pCR™ 4-TOPO™-Vektor wird dieses Prinzip zur Ligation des Inserts genutzt.

Ein selektives Wachstum der Wirtszellen wird durch im Vektor enthaltene Gene für Ampicillin- und Kanamycinresistenz bedingt. Die Selektion auf rekombinante Plasmide erfolgt durch das auf dem Vektor befindliche für *E. coli* letale *control of cell death* B (*ccd*B)-Gen, welches mit dem C-Terminus des *LacZα*-Fragments fusioniert ist. Die Ligation eines Inserts unterbricht die Expression der *LacZα-ccd*B Genfusion, wodurch ein Wachstum der Wirtszellen mit rekombinanten Plasmiden ermöglicht wird.

3.7.8.2 Ligation

Zu je 4 µl PCR-Produkt wurden 1µl Salzlösung sowie 1 µl des Vektors pCR™ 4-TOPO™ hinzugefügt und dieser Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Ligationsreaktion erfolgte eine Kühlung auf Eis.

3.7.8.3 Transformation

Die im TOPO TA Cloning™ Kit for Sequencing (INVITROGEN) enthaltenen kompetenten *E. coli* One Shot™ TOP10 Zellen dienten als Wirtszellen für die rekombinanten Plasmide. Um die Permeabilität der Bakterienzellmembran zu erhöhen und somit das Einschleusen des Vektors zu erleichtern, wurden die Zellen starken Temperaturschwankungen ausgesetzt. Nach Hinzufügen der 6 µl Ligationsreaktion zu den Wirtszellen wurden diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad und anschließend erneut auf Eis gehalten. Um eine erste Zellvermehrung und die Expression der Antibiotika-Resistenzgene zu erzielen, fand nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator (GFL) statt. Nachdem die Transformation vollständig vollzogen war, wurde die gesamte Wirtszellsuspension auf zwei zuvor mit Kanamycin (50 µg/ml Agar) versetzte LB-Agar-Nährböden mit einem sterilen Drygalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.7.9 Plasmidpräparation

3.7.9.1 Plasmidpräparation mittels Miniprep

Von den LB-Agarplatten wurden Klone nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in 5 ml LB-Medium, welches 50 µg Kanamycin/ml Medium enthielt, überführt. Das Wachstum der Zellen fand bei 37 °C unter ständigem Schütteln (GFL) über Nacht statt. Nach dem Anlegen von Glyzerolstocks, wobei 600 µl Bakterienkultur mit 600 µl Glyzerol gründlich durchmischt wurden, erfolgte mit dem Rest der jeweiligen Flüssigkultur eine Plasmidpräparation in Form einer Miniprep. Diese diente, falls ein Anzüchten der Bakterienzellen aus den Glyzerolstocks nicht mehr möglich oder das Insert nicht mehr vorhanden sein sollte, als Reserve für eine erneute Transformation. Bei einem Teil der Proben wurde die so gewonnene Plasmid-DNA auch für eine Sequenzierung genutzt.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin™ Plasmid Kit (MACHEREY & NAGEL). Im Zuge der Plasmidisolierung wurden die für 15 Minuten bei 3000 *g* abzentrifugierten Zellen zunächst in einem RNase-haltigem Puffer resuspendiert. Die Degradation der RNA ist nötig, um deren Bindung an die in einer Schleudersäule untergebrachte Silica-Membran zu verhindern. Die anschließende Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA und Proteine erfolgte durch eine NaOH/SDS-Behandlung. Mittels Kaliumacetat, welches mit SDS einen unlöslichen Komplex bildet, wurden die denaturierten Proteine sowie Zelldebris mit der Zellwand-assoziierten chromosomalen DNA gefällt. Ein nachfolgender Zentrifugationsschritt bei 4 °C unterstützte diese Präzipitation. Zudem wurde infolge der Zugabe des Kaliumacetat-haltigen Puffers eine Neutralisation des alkalischen Lysats erreicht und somit wird die Bindung der renaturierten Plasmid-DNA an die Silica-Membran ermöglicht. Eine weitere Reinigung der in die Säule eingebrachten Plasmid-DNA erfolgte in einem Waschschritt, in welchem ein ethanolhaltiger Puffer Verwendung fand. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl autoklavierten Aqua bidest. eluiert. Alle der Elution vorangegangenen Schritte wurden nach Anleitung des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.7.9.2 Plasmidpräparation mittels Midiprep

Von den zur Präparation vorgesehenen Klonen wurden 50 µl bis 100 µl des jeweiligen Glyzerolstocks (s. 3.7.9.1) in 50 ml Kanamycin-haltigem (50 µg/ml Medium) LB-Medium unter ständigem Schütteln bei 37 °C über Nacht angezüchtet. Am darauf folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension 20 Minuten bei 3000 *g* zentrifugiert und das über dem Pellet befindliche Medium abgenommen.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) sowie dem Nucleobond™ AX-100 Kit (MACHEREY & NAGEL) nach Anleitung des Herstellerprotokolls. Wie bei der Miniprep (s. 3.7.9.1) fand eine alkalische Lyse der Zellen, gefolgt von einer Kaliumdodecylsulfat-Präzipitation, statt. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA geschah mittels Anionenaustauscherchromatographie. Dabei wurde die niedrige Salzkonzentration der Plasmid-DNA-Lösung, welche auf eine zuvor equilibrierte Säule aufgetragenen wurde, schrittweise durch zwei Waschschritte erhöht. Da die zur Elution der Plasmid-DNA erforderliche Salzkonzentration pH-Wert abhängig ist, wurde diesem Umstand mit einem entsprechenden Elutionspuffer Rechnung getragen. Die nach der Elution präzipitierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst.

3.7.9.3 Darstellung der Inserts

In rekombinanten Klonen kann durch Restriktionsenzymspaltung das Insert dargestellt und somit der Erfolg einer Klonierung überprüft werden. Als Restriktionsenzym wurde *Eco*RI (LIFE TECHNOLOGIES) gewählt, da im verwendeten pCR™ 4-TOPO™ -Vektor das Insert von zwei *Eco*RI-Schnittstellen flankiert wird. Dazu wurden in einem 20 µl-Reaktionsansatz 10 µl Plasmid-DNA einer Miniprep bzw. 1 µl Plasmid-DNA einer Midiprep mit 2 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl *Eco*RI (1 U/µl) versetzt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch überprüft.

3.7.10 Sequenzierung der Inserts und Sequenzbearbeitung

3.7.10.1 Automatische Sequenzierung

Das zur automatischen Sequenzierung angewandte Verfahren entspricht in seinem Prinzip der Kettenabbruchreaktion nach SANGER et al. (1977). Durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxy-Nukleotide erfolgt ein basenspezifischer Abbruch während der Elongationsphase der Reaktion, in welcher nur ein Vorwärts- respektive Rückwärtsprimer eingesetzt wird und somit nur eine lineare Amplifikation stattfindet. Infolge des zufälligen Einbaus von einem der vier Didesoxynukleositriphosphate (ddNTPs), deren Fehlen der 3´-OH-Gruppe eine Verknüpfung mit der 5´-Phosphatgruppe eines neu anzufügenden Nukleotids unmöglich macht, variieren die synthetisierten DNA-Stränge in ihrer Länge und der Art des 3´- Endes. Nach Beendigung der Reaktion werden die DNA-Fragmente in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt, wobei ein am unteren Rand des Gels befindlicher Laserscanner die mit unterschiedlichen Floureszenzfarbstoffen markierten ddNTPs detektiert. Die registrierten Signale werden dann durch entsprechende Software in die Nukleinsäuresequenz umgesetzt.

Die Sequenzierung der zu untersuchenden Proben wurde bei der Firma SEQUENCE LABORATORIES, Göttingen in Auftrag gegeben. Hierfür wurden nach einer Konzentrationsmessung der zu sequenzierenden Proben die DNA-Konzentrationen auf jeweils ca. 250 ng/µl eingestellt, die Gefäße zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm™ (RENNER) umwickelt und mit der Post verschickt. Die Übermittlung der Sequenzen und zugehörigen Elektropherogramme erfolgte auf elektronischem Wege per E-Mail.

3.7.10.2 Sequenzbearbeitung und Sequenzidentitätsvergleich

Die Bearbeitung der Sequenzdaten, nämlich das Auffinden der verwendeten Primersequenzen und Entfernen der anhängenden Vektorsequenz, erfolgte mit dem Datenverarbeitungsprogramm Align™ Plus (Sequence Alignment Program Version 4.0, S & E SOFTWARE) und dazugehöriger Zusatzprogramme (SEQUAID Kansas State University, Molecular Genetics Laboratory). Weiterhin wurde der Identitätsvergleich der Vorwärts- und Rückwärtssequenz

eines Klons sowie die Übersetzung in die entsprechenden Aminosäuresequenzen mit diesen Programmen bewerkstelligt.

Zur Feststellung von Identitäten mit bereits in GenBank (NCBI, USA) publizierten Sequenzen anderer Organismen erfolgte mit Hilfe des „basic local alignment search tool“ (BLAST) (NCBI, USA) (ALTSCHUL et al. 1990). Hierbei wurden auf Nukleinsäureebene der BLASTN, auf Aminosäureebene der BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ sowie BLASTP und TBLASTX herangezogen. Die Suche nach konservierten Domänen in den Aminosäuresequenzen erfolgte in der *conserved domain database* mittels des RPSBLAST.

3.8 Suppression Subtractive Hybridization

Die Suppression Subtractive Hybridization (SSH) basiert auf der Technik der subtraktiven Hybridisierung und ermöglicht den Vergleich zweier mRNA-Populationen im Hinblick auf differentiell transkribierte Gene. In der vorliegenden Arbeit werden diese Populationen von den Hypobiose induzierten (L3i) und nicht induzierten (L3ni) dritten *Dictyocaulus*-Larven repräsentiert. Zunächst wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Population, in welcher die spezifischen, differentiell transkribierten Gene enthalten sind, wird als **Tester** (L3i-cDNA) bezeichnet und mit der Referenz-cDNA, dem so genannten **Driver** (L3ni-cDNA), in zwei Schritten hybridisiert. Die Kinetik dieser Hybridisierungsreaktionen bedingt einen Mengenausgleich sowie eine Anreicherung differentiell transkribierter Sequenzen, wobei diese beiden Parameter in zwei folgenden Amplifikationsreaktionen, nämlich der Suppression- und Nested PCR, weiter forciert werden. Neben dieser so genannten **Vorwärts-Subtraktion** fand gleichzeitig eine **reverse Subtraktion** statt, in welcher die beiden Populationen vertauscht werden, also der Driver nun als Tester (L3ni-cDNA) dient und mit der L3i-cDNA subtrahiert wird. Alle Arbeitsschritte erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, nach den Angaben der Herstellerprotokolle.

3.8.1 Reverse Transkription und LD PCR

Mit Hilfe des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD CLONTECH) wurden die zur Durchführung der SSH benötigten cDNAs synthetisiert (s. 3.7.3). Es handelte sich dabei um die cDNA der beiden Larvenpopulationen sowie einer im CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD CLONTECH) enthaltenen Kontroll-mRNA aus humaner Skelettmuskulatur (HSM), die im weiteren Verlauf der Arbeit als Positivkontrolle diente.

3.8.1.1 Erststrang-cDNA-Synthese

Neben den zu untersuchenden Larvenpopulationen (L3ni und L3i) ging die Kontroll-mRNA (HSM) in die reverse Transkription ein. Dabei wurden 0,927 µg L3ni-mRNA, 1,12 µg L3i-mRNA und 1 µg HSM-mRNA revers transkribiert. Für die Kontroll-mRNA wurde ein 10 µl Reaktionsansatz mit den im Herstellerprotokoll angegebenen Mengen der Reaktionskomponenten, für die geringer konzentrierte mRNA der L3ni bzw. L3i aus Isolierung 1 (s. Kapitel 4.2) ein 20 µl-Reaktionsansatz gewählt und entsprechend die doppelte Menge der Reaktionskomponenten verwendet. Das weitere Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll.

3.8.1.2 Zweitstrang-cDNA-Synthese

Für die späteren subtraktiven Hybridisierungen werden ca. 2 µg Driver-cDNA benötigt. Zur Ermittlung der optimalen Anzahl an PCR-Zyklen war ebenfalls ein Testansatz erforderlich. Daher erfolgte für die LD PCR je ein Dreifachansatz für die Proben L3ni, L3i und HSM. Die Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl entsprachen den unter Kapitel 3.7.3.3 beschriebenen. Nachdem 20 als optimale PCR-Zyklenzahl bestimmt worden war, erfolgte die weitere Amplifikation der verbleibenden, bei 4 °C gelagerten Reaktionsansätze mit den noch erforderlichen PCR-Zyklen.

Da sich im Verlauf der Arbeit herausstellte, dass je zwei LD PCR-Ansätze der L3ni, L3i und HSM eine zu geringe cDNA-Ausbeute für die weiteren Schritte lieferten, wurden gewisse Abweichungen von der oben beschriebenen Vorgehensweise der LD PCR vorgenommen. So

wurde von der L3ni- und der L3i-Erststrang-cDNA je 2 µl als Template eingesetzt, des Weiteren für alle drei Proben (L3ni, L3i und HSM) die Zahl der Reaktionsansätze auf sechs erhöht. Abweichend vom unter 3.7.3.3 angeführten Temperaturprofil wurde in den nun 21 PCR-Zyklen die Denaturierungszeit auf 10 Sekunden verkürzt.

3.8.2 Volumenkonzentration mit n-Butanol

Um eine ausreichende Menge an cDNA für spätere Reaktionen zu erhalten, wurden 2x je drei 100 µl umfassende LD PCR-Produkte der L3ni, L3i und HSM zusammengeführt. Da das Probenvolumen für die im nächsten Schritt durchzuführende Säulenchromatographie 70 µl nicht übersteigen durfte, erfolgte eine Einengung der Proben mit n-Butanol. Da dieses kaum mit Wasser mischbar ist, bilden sich zwei Phasen. Die Butanolphase kann bis zu 19 Gewichtsprozent Wasser aufnehmen, wodurch das Volumen der wässrigen Phase verringert wird.

Zur Volumeneinengung der Proben wurden je 800 µl n-Butanol zu den Ansätzen gegeben und nach gründlicher Durchmischung für 1 Minute bei 13 000 *g* zentrifugiert, um die Lösung in eine obere organische und untere wässrige Phase zu trennen. Die obere organische Phase wurde verworfen. Zu der verbleibenden wässrigen Phase, welche die Nukleinsäuren enthielt und deren Volumen noch ca. 100 µl betrug, wurden nochmals 750 µl n-Butanol gegeben. Wieder erfolgte nach gründlicher Durchmischung eine Zentrifugation für 1 Minute bei 13 000 *g* und Verwerfen der organischen Phase. Nach diesem Schritt verblieben ca. 60 µl der eingesetzten Proben, so dass mit der Säulenchromatographie begonnen werden konnte.

3.8.3 Aufreinigung mittels Säulenchromatographie

Für die weitere Durchführung der SSH war ein Enzymverdau erforderlich. Deshalb musste die amplifizierte cDNA von den übrigen Reaktionskomponenten der LD PCR befreit werden. Zudem sollte das PCR-Produkt auch von kurzen, aus degenerierter mRNA transkribierten cDNA-Sequenzen bereinigt werden. Für diesen Zweck wurden die auf dem Prinzip der Gelfiltrations-Chromatographie beruhenden CHROMA SPIN™-1000 DEPC-H_2O Columns (BD CLONTECH) verwendet, welche DNA-Moleküle von weniger als 300 bp zu 99 % aus der

aufgetragenen Probe entfernen. Im Inneren dieser Säulen befindet sich ein Gelbett mit darin eingeschlossenen mikroskopisch kleinen, aus einem hydrophilen porösen Material bestehenden Kügelchen. Moleküle, deren Größe die der Poren übersteigt, wandern sehr schnell durch das Gelbett, wohingegen kleinere Moleküle in den Poren zurückgehalten werden. Im Eluat erscheinen daher die retenierten Moleküle nach sinkender Molekülgröße.

Vor dem Aufbringen der Proben auf die Säulen erfolgte ein Pufferaustausch der Gelmatrices, welche zuvor durch mehrmaliges Schwenken vollständig resuspendiert wurden. Der Puffer, der nach Entfernung der Verschlusskappen sofort aus den Säulen lief, wurde verworfen. Zum Pufferaustausch wurden 1,5 ml 1x TNE Puffer auf die Gelmatrix gegeben. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen. Es erfolgte nun ein langsames Auftragen von je 2 Proben der L3ni-, L3i- und HSM-cDNA in die Mitte des Gelbetts jeweils einer Säule. Im Anschluss daran wurden 25 µl 1x TNE Puffer auf die Gelmatrix appliziert. Nachdem der Puffer vollständig aus der Säule getropft war, wurde dieser Schritt mit 150 µl 1x TNE Puffer wiederholt. Zur Gewinnung der aufgereinigten cDNA aus den Säulen wurden diese in neue 1,5 ml Gefäß verbracht und mit je 320 µl 1x TNE Puffer eluiert. Eine zweite Elution mit je 75 µl 1x TNE Puffer in ein neues 1,5 ml Gefäß schloss sich an.

3.8.4 Gelanalyse der aufgereinigten Proben

Von jedem Eluat der oben beschriebenen Säulenchromatographie wurden nach der Durchführung 10 µl für die Bestimmung der Wiederfindungsrate abgenommen. Neben diesen Aliquots wurden auf das Agarosegel auch je 3 µl der in die Aufreinigung eingegangenen LD PCR-Produkte aufgetragen. Da in der zweiten Eluatfraktion jeweils eine höhere Ausbeute an aufgereinigter cDNA gewonnen werden konnte als nach dem ersten Elutionsschritt, wurden die beiden Eluatfraktionen der L3ni-, L3i- und HSM-Probe in je ein Gefäß zusammengeführt.

3.8.5 Restriktionsenzymverdau

Die Spaltung der aufgereinigten cDNA erfolgte mit Restriktionsenzym *Rsa*I, um kürzere cDNA-Fragmente mit glatten Enden für die spätere Ligation der Adapter zu erhalten. Gleich-

zeitig wurden im Zuge dieses Verdaus auch die bei der cDNA-Synthese angehängten bzw. inkorporierten Primersequenzen von den cDNA-Molekülen entfernt.
Zu den je zwei L3ni-, L3i- und HSM-Proben mit einem Volumen von jeweils 400 µl wurden folgende Komponenten (PROMEGA) hinzugefügt:

45,2 µl	10x Reaktionspuffer C
4,52 µl	acetyliertes bovines Serumalbumin (BSA) (10 µg/µl)
2 µl	*Rsa*I (10 U/µl)

Der Restriktionsenzymverdau erfolgte bei 37 °C für eine Dauer von vier Stunden und wurde anschließend gelelektrophoretisch kontrolliert.

3.8.6 Probenaufreinigung nach Restriktionsenzymverdau

3.8.6.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Den je zwei Restriktionsenzymverdau-Ansätzen der L3ni-, L3i-und HSM-cDNA wurde zur Entfernung der enthaltenen Proteine jeweils 450 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (P:C:I) in einem Mischungsverhältnis von 25:24:1 zugesetzt und nach gründlicher Durchmischung eine Minute bei 13 000 *g* zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit den darin enthaltenen Nukleinsäuren wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und wiederum mit P:C:I versetzt, erneut zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß gegeben. Nach nochmaliger Durchführung dieses Schrittes waren in der Interphase keine Präzipitate mehr sichtbar. Die Proben wurden daraufhin mit je 450 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gründlich gemischt. Im Anschluss an die einminütige Zentrifugation bei 13 000 *g* wurde die obere Phase in ein neues 1,5 ml Gefäß gegeben. Mit der jeweils verbliebenen Interphase sowie unteren Phase wurde eine Rückextraktion vorgenommen, um den Verlust an cDNA möglichst gering zu halten. Hierzu wurden die jeweils verbliebenen Phasen der obigen Extraktion in ein 2 ml Gefäß gegeben und je 200 µl 1x TNE Puffer hinzugefügt, durchmischt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die obere wässrige Phase des L3ni-, L3i- und HSM-Ansatzes wurde abgenommen und auf die entsprechenden Proben der P:C:I/C:I-Extraktion verteilt, die untere Phase und die Interphase wurden verworfen.

3.8.6.2 Säulenchromatographie

Zur Entfernung der 23 bp langen abgespaltenen Primersequenzen aus den mittels Phenol-Chloroform-Extraktion vorgereinigten Proben wurden CHROMA SPIN™-100 DEPC-H_2O Columns (BD CLONTECH) verwendet, deren Porengröße eine über 99 %ige Entfernung von bis zu 30 bp langen Oligonukleotiden bedingt.

Da mit den CHROMA SPIN™-100 Columns nur ein Volumen von 40 bis 75 µl aufgereinigt werden kann, erfolgte eine Einengung der je zwei L3ni-, L3i- und HSM-Proben mit n-Butanol auf das geforderte Volumen wie unter 3.8.2 beschrieben. Weiterhin wurde jede Probe mit 0,5 µl Glykogen (20 µg/µl) (ROCHE) versetzt, um die Ausbeute an cDNA im Eluat zu erhöhen. Der Pufferaustausch der Gelmatrices mit 1x TNE Puffer und die nachfolgende Aufreinigung wurden nach dem beiliegenden Herstellerprotokoll durchgeführt. Abschließend wurden die zwei Eluate der L3ni-, L3i- und HSM-Probe in jeweils ein Gefäß zusammengeführt.

3.8.7 cDNA-Präzipitation

Um eine cDNA-Lösung mit einer Konzentration von mindestens 300 ng/µl für die spätere Adapterligation zu erhalten, erfolgte eine Fällung der cDNA. Als monovalentes Salz wurde Ammoniumacetat verwendet, da dieses in einer Konzentration von 2 bis 2,5 M in der DNA-Lösung die Kopräzipitation von Oligonukleotiden bis 30 bp unterbindet. Zu den je 130 µl aufgereinigter L3ni-, L3i- und HSM-Probe wurden folgende Komponenten gegeben:

2 µl	Glykogen (20 µg/µl) (ROCHE)
58,4 µl	Ammoniumacetat (7,5 M)
476 µl	95 %iges Ethanol

Die Präzipitation fand bei – 20 °C über Nacht statt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 13 000 *g* für 30 Minuten bei 4 °C an. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der Pellets bei RT für ca. 10 Minuten wurden diese in 8 µl Ampuwa™ gelöst.

3.8.8 Konzentrationsbestimmung der cDNA-Lösung

Zur Bestimmung der cDNA-Konzentration in der Lösung wurde die cDNA sechsfach mit Ampuwa™ verdünnt und die OD bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Zur Schaffung annähernd gleicher Konzentrationen an Tester- und Driver-cDNA der zwei Larvenpopulationen wurde die L3i-cDNA mit Ampuwa™ auf eine Konzentration von 510,5 ng/µl verdünnt und somit der L3ni-cDNA-Konzentration von 499,5 ng/µl angeglichen.

Die in dieser Konzentrationsmessung eingesetzte cDNA-Lösung, welche 2 µl gelöste cDNA enthielt, wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu ermitteln, ob die im unter 3.8.5 beschriebenen Restriktionsenzymverdau abgespaltenen Oligonukleotide durch die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Säulenchromatographie aus der cDNA-Lösung entfernt wurden.

3.8.9 Adapterligation

Durch die Ligation von zwei verschiedenen Adaptern an die jeweilige Tester-cDNA wurden jeweils zwei Testerpopulationen der L3ni, L3i und HSM generiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Dieser sowie die noch folgenden Arbeitsschritte der SSH wurden für jede Probe (L3ni, L3i und HSM) wiederholt durchgeführt (**Durchführung 1** sowie **Durchführung 2**).

3.8.9.1 Vorbereitung der Tester-cDNA

L3ni-, L3i-Tester:
Nachdem die cDNAs der beiden Larvenpopulationen in annähernd gleichen Konzentrationen vorlagen, wurde jeweils 1 µl cDNA-Lösungen der L3ni bzw. L3i mit 5 µl Ampuwa™ verdünnt.

<u>HSM-Tester:</u>

Die HSM-Probe dient als Positivkontrolle bei Durchführung der SSH. Um eine Tester-cDNA mit Genfragmenten zu erhalten, die nicht in der Driver-cDNA vorliegen, wurde der HSM-Tester-cDNA eine mit *Hae*III verdaute ϕX174 DNA zugefügt. Bei erfolgreicher subtraktiver Hybridisierung stellt diese Kontroll-DNA nach erfolgter Suppression PCR die prominentesten Gelbanden. Zunächst wurden 2 µl der im Kit enthaltenen Kontroll-DNA mit 38 µl Ampuwa™ versetzt, um eine DNA-Konzentration von 150 ng/µl zu erreichen. Zur Fertigstellung des HSM-Testers wurden 5 µl dieser Verdünnung mit 1 µl der unter 3.8.7 generierten HSM-cDNA vermischt.

3.8.9.2 Ligation der Adapter

Dieser Schritt dient der Herstellung der je zwei Testerpopulationen und der nicht subtrahierten Tester-Kontrolle der L3ni, L3i und HSM durch Adapterligation an das 5´-Ende der cDNA-Moleküle. Jeder Tester wird dabei mit zwei unterschiedlichen Adaptern (Adapter 1 respektive 2R) in separaten Ansätzen ligiert, so dass je **zwei Testerpopulationen** der L3ni-L3i- und HSM-cDNA resultieren. Zur Herstellung der **nicht subtrahierten Tester-Kontrolle (TK)** der L3ni, L3i und HSM wurden je 2 µl der entsprechenden Ligationsansätze von Tester 1 und 2 vermischt, so dass nach erfolgter Adapterligation bei einem Drittel der cDNA-Moleküle unterschiedliche Adapter am 5´-Ende vorliegen. Im Folgenden sind neben den A-daptersequenzen auch die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Primer aufgeführt:

*Sma*I ½ *Rsa*I
Adapter 1: 5´-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3´
3´-GGCCCGTCCA-5´

Nested PCR Primer 1: 5´-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3´

PCR Primer 1: 5´-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3´

Nested PCR Primer 2R: 5´- AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3´

*Eae*I ½ *Rsa*I
Adapter 2R: 5´-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3´
3´-GCCGGCTCCA-5´

Abb. 7: Adaptersequenzen und in den PCRs verwendete Primer (BD CLONTECH)

3.8.9.3 Analyse der Ligationseffizienz

Mindestens 25 % der cDNAs müssen Adapter an beiden Enden besitzen, damit eine erfolgreiche subtraktive Hybridisierung gewährleistet ist. Um dies zu überprüfen, wurde im Anschluss an die Ligation eine PCR durchgeführt, in welcher der PCR Primer 1, dessen Sequenz dem 5´-Ende der Adapter entspricht (s. Abb. 7), mit einem genspezifischen Rückwärtsprimer für die L3 bzw. HSM kombiniert und somit die Adapter-cDNA-Verbindung überspannt wird. Als Referenz für die Ligationseffizienz diente ein Reaktionansatz mit einem genspezifischen Primerpaar. Dieses wurde bei den Ansätzen der L3ni und L3i von dem mit dem Softwareprogramm Lasergene (DNASTAR, Version 5.06) ausgewählten Primer *daf*-1 II for und dem Primer *daf*-1 rev (nach RICKLING 1999) repräsentiert, wobei darauf geachtet wurde, dass das Amplifikationsprodukt keine *RsaI* I-Schnittstelle beinhaltete. Bei den HSM-Ansätzen wurden die im Kit enthaltenen G3PDH Primer (BD CLONTECH) mit folgender Sequenz verwendet:

daf-1 II for:	5´-TCG AAG AAA TGA TGA AGC-3´
daf-1 rev.:	5´-GGA CGG AAG CTG CTA CAA-3´
G3PDH 5´ Primer:	5´-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3´
G3PDH 3´ Primer:	5´-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3´

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Überprüfung der Ligationseffizienz nicht nur mit den Tester-cDNAs, sondern auch der nicht subtrahierten TK bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt und die Proben nach abgeschlossener Amplifikation gelelektrophoretisch analysiert:

	initiale Denaturierung	94 °C, 30 Sekunden	
25x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden	
	Primerannealing	65 °C bei HSM-Ansatz 1 bis 6 57,8 °C bei L3-Ansatz 1 bis 4 59,3 °C bei L3-Ansatz 5 und 6	30 Sekunden
	Primerextension	68 °C, 2,5 Minuten	

3.8.10 Erste subtraktive Hybridisierung

Weisen die Tester eine zufrieden stellende Ligationseffizienz auf, kann mit der subtraktiven Hybridisierung fortgefahren werden. Hierbei wird jeder der zwei Testerpopulationen (s. Kapitel 3.8.9.2) in einem separaten Ansatz nicht Adapter-ligierte Driver-cDNA im Überschuss zugesetzt. Obwohl gleiche Volumina an Tester und Driver vermischt werden, ist ein Driver-Überschuss gegeben, da vor der Adapterligation die unter 3.8.9.1 beschriebene sechsfache Verdünnung der Tester-cDNA mit Ampuwa™ erfolgte. Bedingt durch die Kinetik der ersten subtraktiven Hybridisierungsreaktion verbleiben differentiell transkribierte cDNA-Sequenzen in einem angeglichenem Mengenverhältnis als einzelsträngige Moleküle für die zweite subtraktive Hybridisierung, wohingegen die sowohl in der Tester- als auch in Driver-cDNA vorhandenen Sequenzen Hybridmoleküle bilden (s. Abb. 3). Bei den zwei L3i- bzw. L3ni-Testern wurde jeweils die cDNA der anderen Larvenpopulation als Driver verwendet, den HSM-Testern wurde HSM Driver-cDNA zugesetzt.

3.8.11 Zweite subtraktive Hybridisierung

Nach der ersten subtraktiven Hybridisierung werden die je zwei Ansätze der L3ni, L3i und HSM (s. 3.8.10) ohne vorherige Denaturierung vermischt. Gleichzeitig erfolgt, wiederum im Überschuss, die Zugabe frisch denaturierter Driver-cDNA, was eine weitere Anreicherung und Normalisierung differentiell transkribierter Sequenzen bedingt. Diese Zielsequenzen bilden in der zweiten subtraktiven Hybridisierung Hybridmoleküle mit unterschiedlichen Adaptern an ihren Enden aus (s. Abb. 3), wodurch eine exponentielle Amplifikation in der nachfolgenden Suppression PCR ermöglicht wird.

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde in dieser zweiten subtraktiven Hybridisierung den jeweiligen Proben der **Durchführung 1** die vierfache der angegebenen Menge an Driver-cDNA zugesetzt, wohingegen bei der **Durchführung 2** nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde.

3.8.12 Suppression PCR

In dieser PCR erfolgt durch die selektive Amplifikation ein weiterer Mengenausgleich differentiell transkribierter Sequenzen, da nur cDNAs mit unterschiedlichen Adaptern an den Molekülenden einer exponentiellen Amplifikation unterliegen. Dahingegen kommt es bei Molekülen, die gleiche Adapter an den Enden tragen, zu einem Suppressionseffekt der PCR (s. Abb. 8), welcher durch die Länge der Adapter bedingt ist. Die Hybridisierung dieser langen komplementären Sequenzen, einhergehend mit der Ausbildung so genannter *loops*, ist stabiler als die Hybridisierung des kürzeren PCR-Primers.

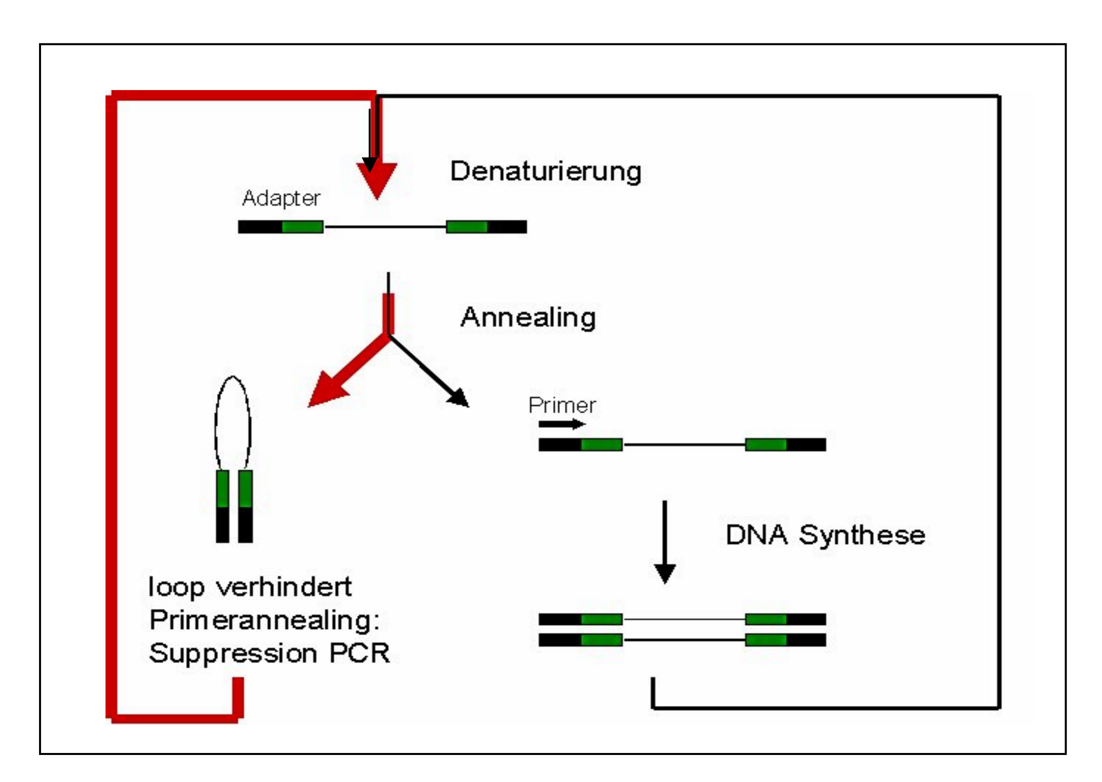


Abb. 8: Schema der Suppression PCR

In dieser PCR, in welcher der in Abb. 7 dargestellte PCR Primer 1 als Universalprimer eingesetzt wurde, dienten neben den subtrahierten Proben auch die verdünnten nicht subtrahierten Tester-Kontrollen der L3ni, L3i und HSM (s. 3.8.9.2) als Matrize, da sie als Kontrollen sowohl einer erfolgreichen Suppression PCR als auch subtraktiven Hybridisierung in den späteren Gelelektrophoresen fungieren sollten. Die subtrahierten Proben der L3ni und L3i gingen dabei jeweils als Doppelansatz in die Reaktion ein. Des Weiteren wurde eine im Kit enthalte-

ne subtrahierte Kontroll-DNA in der PCR, die bei unten stehendem Temperaturprofil ablief, mitgeführt.

	initiale Denaturierung	94 °C, 25 Sekunden
27x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	66 °C, 30 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 1,5 Minuten

.

3.8.13 Nested PCR

Diese PCR, in der dreifach verdünntes Suppression PCR-Produkt als Template diente, erreicht durch die Verwendung von Nested Primern (s. Abb. 7) eine weitere Anreicherung differentiell transkribierter Sequenzen, da analog zur vorangegangenen Suppression PCR nur mit unterschiedlichen Adaptern ligierte cDNAs exponentiell amplifiziert werden. Die Suppression PCR-Doppelansätze der subtrahierten cDNA der L3ni und L3i (s. 3.8.12) wurden auch in dieser Nested PCR als separate Ansätze gehandhabt. In der Amplifikationsreaktion, deren Produkte nachfolgend einer Gelelektrophorese unterzogen wurden, fand das Temperaturprofil der Suppression PCR Anwendung (s. 3.8.12). Abweichend liefen bei einer Annelingtemperatur von 68 °C nur 12 Zyklen ab und auf die initiale Denaturierung wurde verzichtet.

3.8.14 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

Die Analyse der Subtraktionseffizienz dient der Überprüfung einer erfolgreichen Durchführung der SSH. Dies geschah durch einen Vergleich der vorhandenen Menge bekannter cDNA-Sequenzen vor und nach der subtraktiven Hybridisierung in Form einer PCR. Nicht differentiell transkribierte und daher im Zuge der SSH weitestgehend eliminierte Sequenzen lassen bei der Verwendung subtrahierter cDNA als Matrize im Gegensatz zu nicht subtrahierter cDNA mindestens fünf PCR-Zyklen später Banden im Gel erscheinen. Im Idealfall erfolgt dieser Vergleich mit einem nicht differentiell transkribierten Gen, beispielsweise einem Haushaltsgen, sowie einem differentiell transkribierten Gen. Da bei *D. viviparus* weder Se-

quenzen von Haushaltsgenen noch differentiell transkribierten Genen publiziert waren, erfolgte die Amplifikation unter Verwendung des mittels Lasergene (DNASTAR) ausgewählten Primer *daf*-1I for sowie dem Primer *daf*-1 rev (nach RICKLING 1999).

daf-1 I for.: 5′-ACG CGT TTA GCA CTA CTG GTT GT-3′
daf-1 rev.: 5′-GGA CGG AAG CTG CTA CAA-3′

In der PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz dienten die Nested PCR-Produkte der L3ni und L3i als Template, da aus diesen im weiteren Verlauf der Arbeit die subtrahierten cDNA-Banken entstehen und sie zudem als Sonde im Differential Screening Verwendung finden sollten. Um sicherzustellen, dass die Nested PCR-Produkte der subtrahierten cDNAs und der nicht subtrahierten Tester-Kontrollen der L3ni respektive L3i annähernd gleiche cDNA-Konzentrationen aufwiesen, erfolgte vor dem Einsatz als Matrize eine quantitative Bestimmung mit jeweils 10fach verdünnten Nested PCR-Produkt und anschließendem Konzentrationsausgleich. Die PCR lief bei folgendem Temperaturprofil ab:

18x	Denaturierung	94 °C, 30 Sekunden
	Primerannealing	56 °C, 30 Sekunden
	Primerextension	68 °C, 2 Minuten

Nach diesen 18 Zyklen wurde von jeder Probe ein 5 µl-Aliquot entnommen. Daraufhin durchliefen die Proben fünf weitere PCR-Zyklen bei obigem Temperaturprofil, wonach wiederum die Entnahme eines 5 µl-Aliquot erfolgte. Dieser Schritt wurde noch dreimal wiederholt, so dass die Reaktionsansätze der **Durchführung 1** letztlich insgesamt 38 Zyklen durchliefen. Bei der **Durchführung 2** wurde das erste 5 µl-Aliquot nach 23 PCR-Zyklen, das letzte, ebenfalls im Rhythmus von jeweils fünf Zyklen, nach 43 Zyklen entnommen. Mittels dieser Aliquots wurde die Subtraktionseffizienz gelelektrophoretisch analysiert.

3.9 Erstellung subtrahierter cDNA-Banken

Mittels subtrahierter cDNA der L3ni und L3i der **Durchführung 1** erfolgte die Erstellung subtrahierter L3ni- und L3i-cDNA-Banken. Die Überprüfung dieser Banken auf falsch positive Klone gelang im weiteren Verlauf der Arbeit mit Hilfe des Differential Screenings.

3.9.1 Nested PCR mit subtrahierter cDNA

Durch eine Amplifikation des subtrahierten Suppression PCR-Produkts werden in dieser PCR differentiell transkribierte cDNA-Sequenzen weiter angereichert und equalisiert (s. 3.8.13). Das synthetisierte Nested PCR-Produkt unterlag anschließend einer Klonierung zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken der L3ni und L3i.

Neben den unter 3.8.12 synthetisierten subtrahierten Suppression PCR-Produkten der zwei Larvenpopulationen wurden in dieser PCR auch zwei im CLONTECH PCR-Select™ Differential Screening Kit (BD CLONTECH) enthaltene Kontroll-DNAs (C1 und C2R) unter Verwendung der Nested Primer (s. Abb. 7) amplifiziert. Bei diesen Kontroll-DNAs handelt es sich um Plasmide, deren Inserts von zwei humanen Genfragmenten repräsentiert werden, welche die Sequenzen des Nested Primers 1 (C1) und Nested Primers 2R (C2R) beinhalten und somit als Negativkontrollen in der späteren Hybridisierung dienen.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Matrizen für diese Nested PCR. Dazu wurden je 5 µl der C1- bzw. C2R-DNA mit 3 µl Ampuwa™ versetzt und für 5 Minuten bei 96 °C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gehalten. Die im Zuge der Suppression PCR entstandenen Amplifikationsprodukte der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA wurden dreifach mit Ampuwa™ verdünnt, bevor sie als Template eingesetzt wurden. Das Temperaturprofil dieser PCR ist im Folgenden aufgeführt:

11x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	60 °C, 30 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 1,5 Minuten
	finale Elongation	72 °C, 5 Minuten

Nach Ablauf der Reaktion erfolgte eine Amplifikationskontrolle mittels Gelelektrophorese. Anschließend wurden die Nested PCR-Produkte der L3ni und L3i zur späteren Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken wie unter 3.7.8 beschrieben kloniert. Die Hybridisierungs-Negativkontrollen C1 und C2R lagerten bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C.

3.9.2 Insertkontrolle mittels PCR

Von den LB-Agarplatten wurden Klone nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in 5 ml LB-Medium, welches 50 µg Kanamycin/ml Medium enthielt, überführt. Das Wachstum der Zellen fand bei 37 °C unter ständigem Schütteln (GFL) über Nacht statt. Mit Hilfe der PCR wurden die angezüchteten Klone ermittelt, in denen rekombinante Plasmide mit nur einem ligierten Insert vorlagen. Diese Klone dienten im weiteren Verlauf der Arbeit zur Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken. Die 20 µl-Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

2 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
0,6 µl	Nested Primer 1 (10 µM)
0,6 µl	Nested Primer 2 (10 µM)
0,4 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
0,2 µl	Advantage™ II Polymerase Mix
1 µl	Flüssigkultur

Die Amplifikationsreaktion lief bei folgendem Temperaturprofil ab:

	initiale Denaturierung	94 °C, 30 Sekunden
23x	Denaturierung	95 °C, 10 Sekunden
	Primerextension und Elongation	68 °C, 3 Minuten

Von den PCR-Produkten wurden jeweils 5 µl zur Kontrolle des amplifizierten Inserts auf ein Agarosegel aufgetragen. Klone ohne Insert und solche, bei denen zwei oder mehr Banden sichtbar waren, wurden, wie auch die zugehörigen Amplifikationsprodukte, verworfen. Die

PCR-Produkte, welche nur eine Bande im Agarosegel entstehen ließen, wurden bei –20 °C gelagert und im weiteren Verlauf der Arbeit dem Differential Screening unterzogen.

3.9.3 subtrahierte cDNA-Banken

Von den Flüssigkulturen der Klone, die im Zuge der Insertkontrolle eine Bande im Gel aufwiesen, wurden je 600 µl abgenommen, diese mit 600 µl Glyzerol gründlich durchmischt und bei –20 °C gelagert. Diese Glyzerolstocks repräsentierten neben der nachfolgend gewonnenen Plasmid-DNA die subtrahierten L3ni- bzw. L3i- cDNA-Banken.

Nach dem Anlegen der Glyzerolstocks wurde mit dem Rest der jeweiligen Flüssigkultur eine Plasmidpräparation in Form einer Miniprep (s. 3.7.9.1) durchgeführt. Diese diente, falls ein Anzüchten der Bakterienzellen aus den Glyzerolstocks nicht mehr möglich oder das Insert nicht mehr vorhanden sein sollte, als Reserve für eine erneute Transformation.

3.10 Differential Screening

3.10.1 cDNA dot blotting

Für das Differential Screening der subtrahierten L3ni- und L3i-Banken wurden die 104 respektive 105 Amplifikationsprodukte der in Kapitel 3.9.2 beschriebenen Insertkontrolle auf eine positiv geladene Nylonmembran (ROCHE) aufgebracht. Da im Differential Screening als Sonden neben den subtrahierten cDNAs auch die Tester-Kontrollen der L3ni und L3i eingesetzt werden sollten, wurden vier identische Membranen mit den zu überprüfenden L3-cDNAs sowie den Negativkontrollen C1 und C2R angefertigt.

Um eine Hybridisierung der aufgetragenen cDNAs mit der Sonde zu ermöglichen, mussten die Proben zunächst denaturiert werden. Hierzu wurden je 6 µl frisch angesetzter NaOH-Lösung (0,6 M) mit 6 µl PCR-Produkt der L3ni, L3i, C1 und C2R vermengt. Dies geschah, wie auch das nachfolgende Auftragen von 2x je 1 µl Probe auf eine unbehandelte, beschriftete, positiv geladene Nylonmembranen (ROCHE) mit Hilfe der Mehrkanalpipette Matrix Impact2™ (APOGENT DISCOVERIES). Die so präparierten Membranen wurden durch viermi-

nütiges Schwenken in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Es folgten zwei Waschschritte mit autoklaviertem Aqua bidest. Nach einer Lufttrocknung wurde die Membranen in Aluminiumfolie eingeschlagen und die cDNA durch dreißigminütiges Backen bei 120 °C im Wärmeschrank (MEMMERT) zusätzlich fixiert.

3.10.2 Herstellung DIG-markierter cDNA-Sonden

Zur Ermittlung nicht differentiell transkribierter Klone der subtrahierten cDNA-Banken wurden Hybridisierungssonden von subtrahierter und nicht subtrahierter (TK) cDNA der L3ni und L3i hergestellt. Die Sondenmarkierung erfolgte während einer PCR mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG DNA Labeling Mix, ROCHE), bei dem das Digoxigenin (DIG) über eine Alkalilabile Esterbindung an den Nukleotidteil gebunden ist.

3.10.2.1 DIG-Markierung der Sonden mittels PCR

Bei der DIG-Markierung mittels PCR ist das Verhältnis von DIG-dUTP:dTTP von der Sequenzlänge der zu markierenden Sonde abhängig. So wird in der PCR bei bis zu 1 kb langen Sonden ein Verhältnis von 1:3, bei 1-3 kb langen Sonden hingegen von 1:6 verwendet. Dieses Verhältnis wurde auch für die Markierung der bezüglich der Sequenzlänge variierenden cDNAs gewählt. Das in der PCR eingesetzte DIG DNA Labeling Mix (ROCHE) enthielt neben 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-dUTP die übrigen dNTPs in einer Konzentration von je 1 mM. Die Lösung wurde daher zu gleichen Teilen mit einem dNTP Mix von je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP vermischt, um das angestrebte 1:6 Verhältnis zu erreichen. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der subtrahierten und nicht subtrahierten Sonden diente das jeweilige dreifach verdünnte Suppression PCR-Produkt der L3ni und L3i. Folgende 25 µl-Dreifachreaktionsansätze gingen für jede Probe in die PCR ein:

2,5 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
1 µl	Nested Primer 1 (10 µM)
1 µl	Nested Primer 2R (10 µM)
5 µl	dNTP Mix: 1mM dATP 1 mM dCTP 1 mM dGTP 0,825 mM dTTP 0,175 mM DIG-dUTP
0,5 µl	Advantage™ 2 Polymerase Mix
1 µl	Template

Die einzelnen Temperaturschritte entsprachen den unter 3.9.1 beschriebenen Reaktionsbedingungen, allerdings wurde die Denaturierungszeit auf 30 Sekunden verlängert. Nach Ablauf der Reaktion wurden die drei Ansätze je Probe zusammengeführt und einer Gelelektrophorese unterzogen.

3.10.2.2 Aufreinigung der DIG-markierten Sonden

Um optimale Bedingungen für den im nächsten Schritt durchzuführenden Multi-Enzymverdau zu schaffen, mussten die PCR-Pufferbestandteile entfernt werden. Zu diesem Zweck kamen CHROMA SPIN™-100 Columns (BD CLONTECH) zum Einsatz. Somit wurden gleichzeitig nicht inkorporierte Primer, dNTPs und die Polymerasen aus den Sondenlösungen entfernt. Die nötigen Arbeitsschritte erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll.

3.10.2.3 Multi-Enzymverdau

Da sowohl in der PCR zur Markierung der Sonden als auch bei der Amplifikation der auf die Nylonmembranen aufgetropften cDNAs die Nested Primer 1 und 2R Verwendung fanden, bestand die Gefahr falsch positiver Hybridisierungsergebnisse. Durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen *Rsa*I, *Sma*I und *Eae*I (ROCHE) wurden die Nested Primer von den Sonden abgespalten. Die Erkennungssequenzen dieser Enzyme, welche bei *Rsa*I durch die Adap-

terligation an die mit *Rsa*I verdaute cDNA (s. 3.8.5) wieder hergestellt wurden, sind in Abb. 7 dargestellt. Da die Sonden nach der Aufreinigung unterschiedliche Volumina aufwiesen, wurde die zugesetzte Menge an 10x Reaktionspuffer A dem Probenvolumen angepasst. Zunächst wurde zu jeder Probe 1µl *Sma*I (10 U/µl, ROCHE) gegeben und die Reaktionen für 1 Stunde bei 25 °C inkubiert, anschließend wurden den Ansätzen je 2 µl *Rsa*I (10 U/µl, ROCHE) und 1 µl *Eae*I (10 U/µl, ROCHE) hinzugefügt. Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden von jedem Reaktionsansatz je 3 µl abgenommen und diese mit einem Mikroliter einer Plasmid-DNA vermischt. Alle Ansätze wurden für eine Dauer von vier Stunden bei 37 °C verdaut und nachfolgend auf einem Agarosegel analysiert.

Im Anschluss an den Multi-Enzymverdau erfolgte eine Reinigung der Sonden von den abgespaltenen Primern mittels Säulenchromatographie wie unter 3.8.6.2 beschrieben.

3.10.2.4 Überprüfung der DIG-markierten cDNA-Sonden

Die Effizienz der DIG-Markierung durch die PCR beeinflusst die Sensitivität der Sonden und damit deren Konzentration in der Hybridisierungslösung. Des Weiteren war die Überprüfung der vier verschiedenen Sonden im Hinblick auf vergleichbare Ergebnisse des späteren Differential Screenings unerlässlich.

Mittels spektralphotometrischer Messung (AMERSHAM BIOSCIENCES) wurde die cDNA-Konzentration der Sonden bestimmt. Für jede Sonde sowie für eine DIG-markierte Kontroll-DNA (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE) wurde eine Verdünnungsreihe mit DNA-Verdünnungspuffer (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE) erstellt. Die Konzentrationen betrugen dabei pro Mikroliter 10 pg, 3 pg, 1 pg, 0,1 pg, 0,03 pg und 0,01 pg. Von jeder Verdünnungsreihe sowie dem Verdünnungspuffer als Negativkontrolle wurden 2x je 1 µl auf eine unbehandelte, positiv geladene Nylonmembran aufgetragen und die DNA wie unter 3.10.1 beschrieben fixiert. Der Gehalt an DIG-markierter cDNA in den Sondenlösungen sowie deren Nachweisgrenzen wurden durch chemilumineszente Detektion (s. 3.10.3.2) nach dem Protokoll des DIG Application Manual for Filter Hybridization (ROCHE, 2000) bestimmt. Zur Durchführung der erforderlichen Schritte wur-

den die Membranen in Hybridisierungstaschen (ROCHE) eingeschweißt, welche an einer E-cke einen Schraubverschluss besaßen, durch welchen der Pufferwechsel erfolgen konnte.

3.10.3 Hybridisierung und Detektion

3.10.3.1 Hybridisierung

Die mit DIG-11-dUTP markierten cDNA-Sonden bilden bei entsprechender hoher Sequenz-übereinstimmung in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur mit den auf einer Trägermembran fixierten einzelsträngigen cDNAs Hybridmoleküle aus.

Mit den subtrahierten sowie Tester-Kontroll-Sonden der L3ni und L3i wurde je ein cDNA dot blot (s. 3.10.1) hybridisiert. Dabei wurde das nachfolgende Protokoll, wie auch das der sich anschließenden Detektion, strikt eingehalten, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen und somit differentiell transkribierte cDNA-Sequenzen ausfindig zu machen. Nach dem DIG Application Manual for Filter Hybridization (2000, ROCHE) beträgt die optimale Hybridisierungstemperatur für eine DNA:DNA-Hybridisierung von Säugetieren 42 °C, wenn folgende Bedingungen gegeben sind: eine Sequenzhomologie von 80-100 %, die Verwendung von DIG Easy Hyb (ROCHE) oder einem Standardpuffer mit 50 % Formamid und einem GC-Gehalt der DNA von 40 %. In Ermangelung entsprechender Angaben für Nematoden wurde diese Hybridisierungstemperatur auch in dieser Arbeit gewählt. In Vorversuchen wurde als optimale Sondenkonzentration 16,5 ng markierte cDNA-Sonde/ml Hybridisierungslösung ermittelt. Da jedoch bei der Überprüfung der Sonden (s. 4.5.2) die L3ni-Tester-Kontroll-Sonde eine geringere Sensitivität als die übrigen Sonden aufwies, wurde von dieser die 2,5fache Menge in der Hybridisierung eingesetzt. Die Membranen wurden vor Beginn der folgenden Arbeitsschritte in eine Hybridisierungstasche (ROCHE) eingeschweißt, um eine NH_4-Freisetzung und damit einhergehende pH-Wert-Veränderung der Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung zu verhindern.

Zunächst wurden 50 µl Blockierungslösung (CLONTECH PCR-Select™ Differential Screening Kit, BD CLONTECH) für 10 Minuten bei 99 °C denaturiert und anschließend fünf Minuten im Eiswasserbad abgekühlt. Die Blockierungslösung enthält gescherte Heringsperma-

DNA (10 mg/ml), um unspezifische Bindungsstellen auf der Trägermembran zu besetzen. Weiterhin sind Oligonukleotide (0,3 mg/ml) enthalten, die den Nested Primern bzw. deren komplementären Sequenzen entsprechen und daher mit den korrespondierenden Sequenzen der mittels Nested PCR synthetisierten cDNAs der dot blots hybridisieren. Somit werden falsch positive Signale durch eventuell noch an der cDNA-Sonde vorhandene Primersequenzen weitestgehend ausgeschlossen. 45 ml einer auf 42 °C vorgewärmten Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, ROCHE) wurden mit der denaturierten Blockierungslösung versetzt, auf die in der Hybridisierungstasche befindliche Membran gegeben und diese anschließend luftblasenfrei mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die Prähybridisierung erfolgte für 1,5 Stunden bei 42 °C und 82 rpm im Wasserbad (GFL). Für die nachfolgende Hybridisierung wurden je 495 ng markierte cDNA-Sonde und 50 µl Blockierungslösung (BD CLONTECH) wie oben beschrieben denaturiert, abgekühlt und mit 30 ml einer auf 42 °C vorgewärmten Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, ROCHE) vermischt. Somit lag eine Sondenkonzentration von 16,5 ng/ml Hybridisierungslösung statt der im Benutzerhandbuch (ROCHE) empfohlenen Konzentration von 25 ng/ml Hybridisierungslösung vor. Diese wurde nach dem Abgießen der Prähybridisierungslösung durch einen 45 µm-Zelluloseacetat-Einweg-Filterhalter (RENNER) auf die Membran verbracht und die Hybridisierungstasche wieder luftblasenfrei verschlossen. Die Hybridisierungsreaktion lief dann bei 42 °C und 82 rpm für 22 Stunden im Wasserbad (GFL) ab.

Im Anschluss an die Hybridisierung schlossen sich vier Waschschritte zur Denaturierung von Hybridmolekülen aus nicht homologen cDNAs an. Dazu wurden die Membranen in eine Plastikschale überführt und zweimal mit je einem Liter Niedrig-Stringenzpuffer (2x SSC; 0,1 % SDS) für 10 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte bei 68 °C mit jeweils einem Liter auf 68 °C vorgewärmten Hoch-Stringenzpuffer (0,5x SSC; 0,1 % SDS) für eine Dauer von 20 Minuten unter leichtem Schütteln im Wasserbad (GFL).

3.10.3.2 Detektion

Die Visualisierung der im vorangegangenen Hybridisierungsschritt gebildeten Hybridmoleküle erfolgte mittels chemilumineszenter Detektion. Hierzu wurde ein mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter, gegen Digoxigenin gerichteter Antikörper auf die Membranen verbracht. Dessen Position wird durch die Zugabe eines von der Phosphatase umsetzbaren Substrates sichtbar gemacht. Damit kann indirekt auch die Position der hybridisierten Sonde bestimmt werden. Als Substrat diente CSPD™ (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE), dessen enzymatische Dephosphorylierung zur Bildung eines meta-stabilen Dioxetan Phenolat-Anions führt, welches zerfällt und dabei in gepufferter Lösung Licht von 477 nm emittiert. Diese Lichtsignale wurden auf einem Chemilumineszenzfilm sichtbar gemacht.

Die Stammlösungen der in der Detektion verwendeten Puffer aus dem DIG Wash and Block Buffer Set (ROCHE) wurden entsprechend den Herstellerangaben zu gebrauchsfertigen Lösungen verdünnt. Alle Inkubationen erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.

Nachdem die hybridisierte Membran für zwei Minuten in 500 ml Waschpuffer gewaschen worden war, folgte eine Inkubation in 500 ml Blockierungslösung für 45 Minuten. Von der Oberfläche des im DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II (ROCHE) enthaltenen Anti-Digoxigenin-AP Konjugats (750 U/ml), welches zuvor 5 Minuten bei 10 000 *g* zentrifugiert worden war, wurden 8 µl abgenommen und 10 000fach in 80 ml Blockierungslösung verdünnt. Diese Antikörperlösung wurde der Membran für eine 30 minütige Inkubation zugegeben, gefolgt von zwei Waschschritten mit einer Dauer von je 20 Minuten in 500 ml Waschpuffer. Nachdem die Membran 3 Minuten in 80 ml Detektionspuffer inkubiert worden war, wurde sie in eine Hybridisierungstasche (ROCHE) verbracht und mit CSPD™, *ready to use* (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE) beträufelt. Nach 5 Minuten wurde mit einem Rollgerät überschüssiges CSPD™ entfernt und die Membran luftblasenfrei in der Hybridisierungstasche eingeschweißt, woran sich eine Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C zur Steigerung der Lumineszenz anschloss.

Die Sichtbarmachung der entstehenden Lichtsignale erfolgte mit Hilfe von KODAK BioMax™ Light Filmen (AMERSHAM BIOSCIENCES), deren obere linke Ecke zur späteren Orientierung abgeschnitten wurde. Nach einer Reinigung der Hybridisierungstasche mit der darin befindlichen Membran mittels Ethanol fand eine Filmexposition für 1,5 Stunden statt, nachfolgend wurde ein weiterer Film für 40 Minuten auf der Membran belassen. Die Entwicklung und Fixierung der Filme mit anschließender Trocknung bei Raumtemperatur geschah durch Verwendung des KODAK GBX Developer und KODAK GBX Replenisher (INTEGRA) nach Herstellerprotokoll.

3.11 Verifizierung differentiell transkribierter Sequenzen mittels cDNA dot blot

Nach der Identifikation differentiell transkribierter Gensequenzen mit Hilfe des Differential Screenings erfolgte eine weitere Hybridisierung der in den subtrahierten cDNA-Banken enthaltenen Sequenzen zum Ausschluss nur artifiziell angereicherter cDNA-Sequenzen und damit falsch positiver Klone. Diese Verifizierung der als differentiell transkribiert angesehenen Sequenzen erfolgt üblicherweise mittels einer mRNA-Hybridisierung im Northern Blot. Da für eine Northern Blot-Analyse 10 µg bis 20 µg Gesamt-RNA bzw. bei *low copy*-Transkripten 5 µg bis 10 µg mRNA erforderlich sind, konnte diese Methode aus Mangel an Untersuchungsmaterial nicht durchgeführt werden. Alternativ wurde eine erneute Hybridisierung der Sequenzen der subtrahierten cDNA-Banken in Form eines Southern dot blottings vorgenommen. Dazu wurden aus frisch isolierter mRNA der L3ni und L3i cDNA-Sonden synthetisiert, deren Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP (ROCHE) im Zuge einer LD PCR erfolgte.

3.11.1 Southern dot blotting

Zur Verifizierung der in den subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA-Banken enthaltenen 104 bzw. 105 Sequenzen mittels einer L3ni- und L3i-cDNA-Sonde wurden zwei identische Membranen wie unter 3.10.1 beschrieben angefertigt. Als Negativkontrolle für die spätere Hybridisierung diente hierbei das SMART™ II Oligonukleotid (10 µM, SMART™ PCR cDNA Synthesis

Kit, BD CLONTECH, s. Abb. 5) welches neben den Insert-Amplifikationsprodukten (s. 3.9.2) der cDNA-Banken auf die positiv geladenen Nylonmembranen (ROCHE) aufgebracht wurde.

3.11.2 Herstellung DIG-markierter cDNA-Sonden

3.11.2.1 Reverse Transkription

In die Erststrang-cDNA-Synthese mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD CLONTECH, s. Kapitel 3.7.3.1) gingen 1,15 µg L3ni-mRNA und 1,35 µg L3i-mRNA aus der zweiten mRNA-Isolierung (s. 4.2) ein. Mit Ausnahme der Verdünnung der fertigen Erststrang-cDNA in 90 µl Ampuwa™ statt in 450 µl TE Puffer wurde nach Anweisung des Herstellerprotokolls vorgegangen. Die Sequenz des PCR Primers ist in Abb. 5 dargestellt.

3.11.2.2 Bestimmung der optimalen Anzahl an LD PCR-Zyklen

Vor der DIG-Markierung der zwei cDNA-Populationen wurde zunächst die optimale Zyklenzahl der LD PCR ermittelt. Der 25 µl- Testansatz der L3ni bzw. L3i enthielt die folgenden Komponenten:

2,5 µl 10x Advantage™ 2 PCR Buffer
1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
1 µl PCR Primer (10 µM)
1 µl Advantage™ 2 Polymerase Mix
1 µl verdünnte Erststrang-cDNA

Die Amplifikation fand bei unten stehendem Temperaturprofil statt. Abweichend von dem unter 3.7.3.3 beschriebenen Vorgehen wurden 5µl-Aliquots nach 18, 21 und 24 PCR-Zyklen entnommen und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

	initiale Denaturierung	95 °C, 1 Minute
18x bzw. 3x	Denaturierung	95 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	65 °C, 30 Sekunden
	Primerextension	68 °C, 6 Minuten

3.11.2.3 cDNA-Sondenherstellung mittels LD PCR

Die Sondenmarkierung erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG DNA Labeling Mix, ROCHE; s. 3.10.2) im Zuge der LD PCR. Auf Grund der variierenden Sequenzlängen der cDNA-Moleküle wurde ein DIG-dUTP:dTTP-Verhältnis von 1:6 gewählt (s. 3.10.2.1).
Für beide Larvenpopulationen erfolgten je drei 25 µl-Reaktionsansätze, welche die folgende Komponenten enthielten:

2,5 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer	
1 µl	PCR Primer (10 µM)	
7,5 µl	dNTP Mix:	1mM dATP
		1 mM dCTP
		1 mM dGTP
		0,825 mM dTTP
		0,175 mM DIG-dUTP
1 µl	Advantage™ 2 Polymerase Mix	
1 µl	verdünnte Erststrang-cDNA	

Die PCR liefen bei dem unter 3.11.2.2 aufgeführten Temperaturprofil über 24 Zyklen ab, abschließend wurden die je drei Amplifikationsprodukte der L3ni und L3i zusammengeführt und gelelektrophoretisch analysiert.

3.11.2.4 Restriktionsenzymspaltung

Im Anschluss an die Herstellung der Sonden wurden diese einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Rsa*I unterzogen, um die angehängten Oligonukleotide bzw. inkorporierte Primer (s. Abb. 5) und deren komplementäre Sequenzen zu entfernen. Dieser Verdau wurde angesetzt, da auch die Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese der in den subtrahierten cDNA-Banken enthaltenen Inserts mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD CLONTECH) erfolgte. Diese cDNAs unterlagen bereits bei der Durchführung der SSH eine Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I (s. 3.8.5). Dennoch konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Inserts, welche ein 5´- oder 3´-Ende dieser geschnittenen cDNAs repräsentieren, infolge eines eventuell unvollständigen Enzymverdaus noch die oben erwähnten Oligonukleotidsequenzen beinhalteten und somit bei der Verwendung einer ungeschnittenen Sonde die Gefahr falsch positiver Ergebnisse in der späteren Detektion der Sondensignale bestand.

Bevor die Proben in den *Rsa*I-Verdau eingingen, wurden die cDNA-Sonden der L3ni und L3i mittels CHROMA SPIN™-100 DEPC-H_2O Columns (BD CLONTECH, s. 3.8.3) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt, um optimale Reaktionsbedingungen für das Restriktionsenzym zu schaffen. Nach erfolgter Aufreinigung wurde den Proben die entsprechende Menge an 10x Reaktionspuffer L sowie jeweils 2 µl *Rsa*I (10 U/µl, ROCHE) hinzugefügt. Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden von den zwei Ansätzen je 3 µl abgenommen und mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach Ablauf der Spaltungsreaktion, welche für vier Stunden bei 37 °C erfolgte, wurden die Proben auf einem Agarosegel analysiert.

Im Anschluss an den Enzymverdau fand abermals der oben aufgeführte Reinigungsschritt statt, um die Sondenlösung von den abgespaltenen Primern und zugesetzten Reaktionskomponenten zu befreien.

3.11.2.5 Hybridisierung und Detektion

Die Überprüfung der Nachweisgrenze der cDNA-Sonden und somit Feststellung des Gehalts an DIG-markierter cDNA in den Sondenlösungen der L3ni und L3i erfolgte wie unter 3.10.2.4 erläutert. Bei der Hybridisierung sowie der Detektion wurde nach dem unter 3.10.3

beschriebenen Protokoll vorgegangen. Abweichend kamen jedoch 25 ng Sonde/ml Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, ROCHE) zum Einsatz und die Dauer der Filmexposition (Kodak BioMax™ Light, AMERSHAM BIOSCIENCES) betrug beim ersten Film 1,5 Stunden, gefolgt von einer 3,5 stündigen Exposition des zweiten Films.

3.12 Selektion und weitere Bearbeitung differentiell transkribierter Genfragmente

3.12.1 Selektion differentiell transkribierter cDNA-Sequenzen

Die Auswahl der Klone mit differentiell transkribierten Insert-Sequenzen der L3i bzw. L3ni erfolgte auf der Grundlage unterschiedlicher Signalintensitäten der cDNA-dots auf den entwickelten Filmen. Für diesen Vergleich wurden die 40 Minuten belichteten Filme des Differential Screenings sowie die 1,5 Stunden belichteten Filme der Verifizierungs-Hybridisierung herangezogen. Als Hauptkriterium für eine differentielle Transkription galt das Ausbleiben eines Signals bei der Hybridisierung mit subtrahierter cDNA der in der SSH als Driver eingesetzten Larvenpopulation. Des Weiteren wurden Klone ausgewählt, die einen deutlichen Signalunterschied bei der Verwendung der entsprechenden Tester-cDNA- und Tester-Kontroll-Sonde im Gegensatz zur jeweiligen Driver-cDNA- und zugehöriger nicht subtrahierter Kontroll-Sonde erkennen ließen. Hierbei wurde jedoch einschränkend eine stärkere Signalintensität bei der Hybridisierung mit subtrahierter als mit nicht subtrahierter Tester-cDNA gefordert. Bezüglich der Verifizierungs-Hybridisierung wurde festgelegt, dass die Signalstärke bei der Hybridisierung mit der ursprünglich als Driver eingesetzten cDNA die der Tester-cDNA nicht übersteigen durfte, ein bestehendes Signal wurde jedoch nicht verlangt.

3.12.2 Plasmidpräparation, Sequenzierung und Sequenzidentitätsvergleich

Die Klone der subtrahierten cDNA-Banken, deren Inserts im Differential Screening als differentiell transkribiert identifiziert und anschließend durch erneute Hybridisierung als verifiziert galten, wurden sequenziert. Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA für die spätere Sequenzierung erfolgte eine Midiprep der zuvor in 50 ml Kanamycin-haltigem (50 µg/ml Medium) LB-Medium angezüchteten Klone, welche mittels Restriktionsenzymverdau über-

prüft wurde (s. Kapitel 3.7.9.2 und 3.7.9.3). Zur Kontrolle der richtigen Insertlänge wurde jeweils das entsprechende, auf die Nylonmembranen aufgetragene cDNA-Fragment (s. 3.9.2) in der gelelektrophoretischen Analyse des *Eco*RI-Verdaus mitgeführt.

Die von den SEQUENCE LABORATORIES übermittelten Sequenzen wurden mit dem Programm Align™ Plus bearbeitet und in die möglichen Aminosäuresequenzen übersetzt. Mittels BLASTN sowie dem BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ erfolgte ein Vergleich mit in GenBank (NCBI) publizierten Sequenzen auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (s. 3.7.10). Auf Grund eines möglichen Stopcodons in der untranslatierten Region (UTR) am 5´-Ende der mRNA und damit in der cDNA oder der Entstehung eines solchen durch Fehler der Polymerase, der Plasmidreplikation oder der Sequenzierreaktion gingen die Fragmente, welche noch keine signifikanten Homologien aufwiesen, nochmals mit Hilfe des TBLASTX in den Sequenzidentitätsvergleich ein. Der TBLASTX übersetzt dabei eine gegebene Nukleinsäuresequenz in die möglichen Aminosäureabfolgen ohne die Translation an einem Stopcodon zu beenden. Der Identitätsvergleich erfolgt dann mit den in der GenBank enthaltenen Proteinsequenzen. Ergaben sich hierbei signifikante Homologien, wurde mittels Align™ Plus der betreffende Leserahmen hinter dem Stopcodon in die Aminosäuresequenz translatiert und diese wiederum mit dem BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ in ihrer Gesamtheit als auch ab dem ersten Methionin auf Identitäten überprüft.

3.13 Charakterisierung der differentiell transkribierten Genfragmente

Die differentiell transkribierten Genfragmente der L3ni und L3i, die im Sequenzidentitätsvergleich signifikante Homologien aufwiesen, sollten mit der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (FROHMAN et al. 1988) vervollständigt werden und dienten daher als Sequenzgrundlage für die Herstellung genspezifischer Vorwärts- (GSP for) und Rückwärtsprimer (GSP rev). Konnte mittels der RACE das 5´-Ende der Genfragmente nicht vollständig ermittelt werden, sollte eine *spliced leader* 1 (SL1-) PCR als weitere Möglichkeit zur Identifizierung des unbekannten 5´-Endes dienen.

3.13.1 Design der RACE- und SL1-Primer

Die genspezifischen Primer (GSP) für die RACE wurden unter dem Aspekt ausgewählt, eine Schmelztemperatur von mindestens 68 °C, im Idealfall jedoch 70 °C bis 72 °C zur Durchführung einer Touchdown PCR (s. 3.13.2 und 3.13.3) aufzuweisen. Dies ging neben einer Primerlänge von bis zu 45 Nukleotiden auch mit weniger stringenten Anforderungen an die übrigen unter 3.7.4 beschriebenen Parameter einher. Die in der 3´- und 5´-RACE verwendeten GSP for und GSP rev sind im Kapitel 9.1 dargestellt, wobei die mit „5´" respektive „3´" bezeichneten Primer in der 5´- bzw. 3´-RACE eingesetzt wurden.

Die Sequenzen des Primerpaares L3i 99A sowie L3i 99 rev fanden sich jeweils in den cDNA-Sequenzen der teilidentischen Klone L3i 18, L3i 86 und L3i 99, der Primer L3i 99for war spezifisch für die Sequenz dieses Klons. Bezüglich der teilidentischen Klone L3i 82 und L3i 101 wurde der Primer L3i 82 rev spezifisch für den Klon L3i 82 gewählt, wohingegen die Sequenz der Primer L3i 82for und 5´-L3i 82 in der Insertsequenz beider Klone zu finden war.

Für die Insertsequenzen L3ni 67 sowie L3i 33, L3i 53 L3i 75, L3i 88 und L3i 99 wurde zur Erstellung des 5´-Endes weiterhin ein genspezifischer Rückwärtsprimer für die SL1-PCR ausgewählt. Da in dieser PCR die Annealingtemperatur 62 °C betragen sollte, wurde bei der Auswahl der Primer, die unter 9.1 mit „SL1" bezeichnet sind, eine Schmelztemperatur von 64 °C bis 71 °C gefordert.

3.13.2 Überprüfung der RACE-Primer

Dieser Vorversuch diente der Überprüfung der Funktionalität und Spezifität der für die einzelnen Genfragmente ausgewählten GSP for und GSP rev. In der Touchdown PCR diente, je nachdem welcher Larvenpopulation die GSPs zugehörig waren, cDNA der L3ni bzw. L3i als Matrize. Die 20 µl-Ansätze enthielten folgende Reagenzien:

2 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
1 µl	GSP for (50 µM)
1 µl	GSP rev (50 µM)
0,4 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
0,2 µl	Polymerase Mix
1 µl	cDNA

Folgendes Temperaturprofil fand in der Touchdown PCR Anwendung:

Zyklen	Schritt	Bedingungen
5x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing und -extension	72 °C, 3 Minuten
5x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	70 °C, 15 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 3 Minuten
20x	Denaturierung	94 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	68 °C, 15 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 3 Minuten

Nach Ablauf der PCR wurden die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch analysiert. Da die Amplifikationsprodukte der GSP einiger Klone zwei oder drei Banden im Agarosegel entstehen ließen, wurden zur Klärung dieses Umstandes die entstandenen Banden aus dem Gel isoliert, kloniert und anschließend sequenziert (s. 3.7.7 bis 3.7.10).

3.13.3 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Repräsentieren cDNAs lediglich ein Fragment der entsprechenden mRNA-Sequenzen, ermöglicht die Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) den Erhalt der vollständigen Nukleinsäuresequenz durch eine Amplifikation zwischen der bekannten Region und dem 3´- oder 5´-Ende der mRNA (FROHMAN et al. 1988). In dieser PCR, die je nach zu amplifizierendem Ende als 3´- oder 5´-RACE bezeichnet wird, kommen ein aus der bekannten Sequenzregion hergeleiteter genspezifischer Primer sowie ein universeller Primer zum Einsatz. Dieser hybri-

disiert mit dem zu amplifizierenden Ende, so dass die unbekannte Sequenz am 3´- bzw. 5´-Ende der cDNA durch eine Sequenzierung erkannt werden kann.

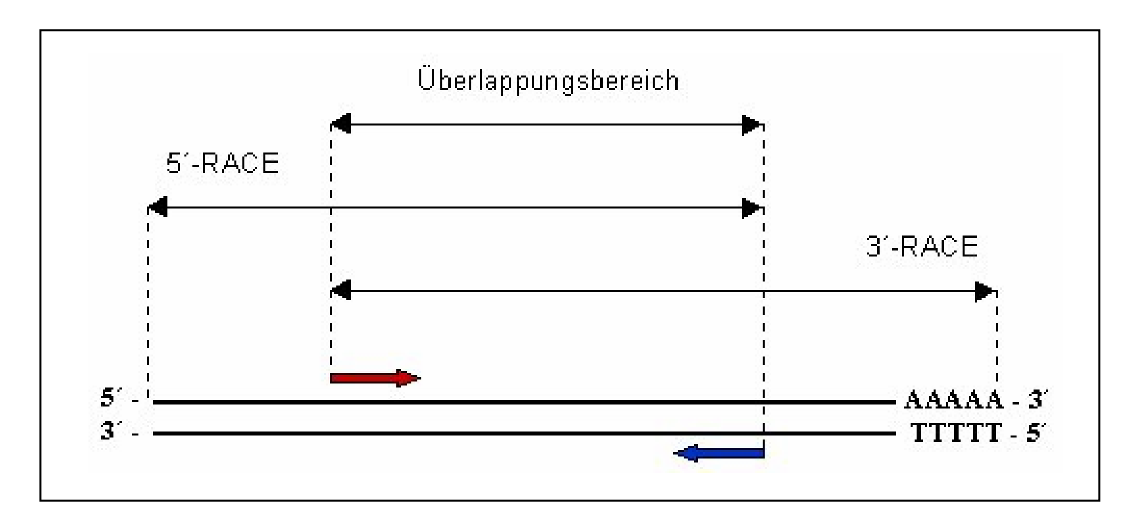


Abb. 9: Schematische Darstellung der RACE

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD CLONTECH) werden die Bindungsstellen für zwei universelle Primer (Universelles Primer A Mix, UPM) durch den Einsatz verschiedener Oligonukleotide (s. Abb. 10) generiert. Dies geschieht im Zuge einer reversen Transkription und sich anschließender PCR.

In der 5´-RACE erfolgt die reverse Transkription mittels eines Oligo(dT)-Primers, dem so genannten 5´-RACE cDNA Synthesis (CDS) Primer. Dieser bindet an die am 3´-Ende fast aller eukaryontischen mRNAs vorliegende homopolymere Poly-A-Sequenz. Die Synthese des 5´-Endes der Erststrang-cDNA beruht auf dem unter 3.7.3.1 beschriebenen Template Switching der MMLV-RT, wobei die komplementäre Sequenz des SMART™ II A Oligonukleotid, welche als Primerbindungsstelle fungiert, der entstandenen Erststrang-cDNA angefügt wird. Erfolgt jedoch ein unerwünschtes Priming durch das SMART™ II A Oligonukleotid, besitzen die entstehenden cDNA-Moleküle diese Sequenz an beiden Enden, was eine Hintergrund-Amplifikation in der 5´-RACE zur Folge hätte. Aus diesem Grund wird die 5´-RACE als Suppression PCR durchgeführt (s. Abb. 8). Die erforderlichen *inverted repeats* an den Enden der cDNA werden durch eine Step-out PCR generiert, in welcher ein Mix aus zwei Primern die Inkorporation dieser zusätzlichen Sequenzen bedingt. Ein Primer beinhaltet diese Sequenz als einen nicht hybridisierenden Überhang, welcher den Enden des Templates in den

ersten Zyklen der PCR hinzugefügt wird (MATZ et al. 1999). In den folgenden PCR-Zyklen dient ein zweiter, zu der Überhangssequenz komplementärer, kürzerer Primer als Startsequenz für die Polymerase. Dieser zweite Primer liegt in einer viel höheren Konzentration im Primermix vor. Daher tritt im Zuge dieser Step-out PCR, bedingt durch die Länge der *inverted repeats*, bei SMART™ II A Oligonukleotid-geprimten Sequenzen ein Suppressionseffekt ein. So erfolgt bei der Verwendung des UPM und GSP rev eine exponentielle Amplifikation nur der cDNA-Moleküle, die am 5´-Ende von der komplementären SMART-Sequenz und am 3´-Ende von der Oligo(dT)-Sequenz flankiert sind.

Die Poly-A-Sequenz der mRNA wird in der **3´-RACE** insofern genutzt, als dass in der reversen Transkription zur Erststrang-cDNA-Synthese ein modifizierter Oligo(dT)-cDNA Synthesis (CDS) Primer Verwendung findet, an dessen 5´-Ende eine Adaptersequenz angehängt ist, die dem SMART™ II A Oligonukleotid entspricht. Die Vervielfältigung des 3´-Endes geschieht in der darauf folgenden PCR durch den Einsatz des UPM und GSP for.

Die Amplifikation des unbekannten 3´- und 5´-Endes erfolgte durch eine Touchdown PCR (DON et al. 1991), in welcher die Annealingtemperatur schrittweise gesenkt wird. Diese ist in den ersten PCR-Zyklen höher als die Schmelztemperatur der universellen Primer, wodurch nur eine Elongation der GSPs erfolgt. Nach dieser Anreicherung an genspezifischem Amplifikationsprodukt wird die Annealingtemperatur soweit reduziert, dass die universellen Primer ebenfalls hybridisieren können und eine exponentielle Amplifikation des genspezifischen 3´- oder 5´-Endes möglich ist.

SMART™ II A Oligonukleotid: 5´-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3´

3´-RACE CDS Primer : 5´-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT$_{(30)}$N$_{-1}$N-3´
(N = A, C, G oder T; N$_{-1}$ = A, C oder G)

5´-RACE CDS Primer: 5´- T$_{(25)}$N$_{-1}$N-3´
(N = A, C, G oder T; N$_{-1}$ = A, C oder G)

UPM: 5´-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3´ (0,4 µM)
5´-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3´ (2 µM)

Abb. 10: In der RACE verwendete Oligonukleotide (BD CLONTECH)

Für die Durchführung der RACE, die, soweit nicht anders vermerkt, nach Anleitung des Herstellerprotokolls erfolgte, wurde zunächst wie unter 3.7.1 beschrieben, mRNA aus den Hypobiose induzierten und nicht induzierten *D. viviparus*-Larven isoliert (Isolierung 3, s. 4.2). In die Erststrang-cDNA-Synthese für die 3´- bzw. 5´-RACE gingen je 285 ng mRNA der L3ni und 643 ng mRNA der L3i ein. Die Touchdown PCR, in der die entsprechende L3ni- bzw. L3i-Erststrang-cDNA als Template diente, lief bei dem unter 3.13.2 aufgeführten Temperaturprofil mit 35 Zyklen im dritten Reaktionsschritt ab. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte im Agarosegel visualisiert.

Da sich insbesondere das 5´-Ende bei einigen cDNA-Fragmenten zunächst nicht darstellen ließ, wurde für die 5´-RACE eine erneute Erststrang-cDNA-Synthese unter Verwendung des entsprechenden reversen Primers kombiniert mit dem jeweiligen 5´-Primer (s. 9.1) anstelle des 5´-RACE CDS Primers durchgeführt, um somit gezielt nur genspezifische oder verwandte mRNA-Moleküle revers zu transkribieren. Dabei wurde für jeden dieser Klone eine separate Reaktion angesetzt, in welcher je 1696 ng L3ni-mRNA bzw. 463 ng L3i-mRNA aus Isolierung 4 (s. 4.2) eingesetzt wurden, das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben. Zudem wurde ein drittes Mal Erststrang-cDNA für die 5´-RACE nach Herstellerprotokoll synthetisiert, wobei 1408 ng L3ni-mRNA und 1216 ng L3i-mRNA (Isolierung 5, s. 4.2) in die Reaktion eingingen.

Je differentiell transkribiertem Genfragment wurden ein bis fünf Banden der 3´- respektive 5´-RACE kloniert, jeweils drei Kolonien angezüchtet und einer Plasmidpräparation unterzogen. Es folgte die Sequenzierung eines oder mehrerer Klone pro Bande in beide Richtungen (s. 3.7.8 bis 3.7.10). In den übermittelten Sequenzen wurden die GSP- und UPM-Sequenzen aufgesucht und letztere von der Sequenz entfernt. Anschließend wurden die RACE-Sequenzen mittels Alignment auf Überlappungsbereiche mit der bereits bekannten cDNA-Sequenzregion überprüft. Anhand dieser überlappenden Sequenzabschnitte konnte das cDNA-Fragment in 3´- bzw. 5´-Richtung verlängert werden. Der Identitätsvergleich mit publizierten Sequenzen sowie konservierten Domänen erfolgte mittels BLASTN, BLASTP und RPSBLAST (NCBI), wobei auf Aminosäureebene neben der Gesamtsequenz auch die Sequenz ab dem ersten Methionin, dem potentiellen Startcodon, in den BLAST einging.

3.13.4 Spliced leader 1 (SL1-) PCR

Neben der RACE stellt die *spliced leader* 1 (SL1-) PCR eine weitere Möglichkeit dar, ein cDNA-Fragment in 5´-Richtung zu vervollständigen. Die 22 bp lange SL1-Sequenz wird durch trans-Spleißen dem 5´-Ende der meisten mRNAs von verschiedensten Nematoden angehängt (BLAXTER u. LIU 1996). Das Vorkommen der SL1-Sequenz bei *D. viviparus* ist bislang allerdings nicht belegt.

Die SL1-PCR wurde unter Verwendung der jeweiligen mit dem 5´-RACE CDS Primer generierten L3i- und L3ni-Erststrang-cDNAs (Isolierung 3) durchgeführt. Als Primer dienten neben den entsprechenden genspezifischen Rückwärtsprimern (SL1-GSP, s. 3.13.1 und 9.1) der untenstehende SL1-Primer, dessen Sequenz der Literatur entnommen wurde (TAKACS et al. 1988).

SL1-Primer:	5´-GGT TTA ATT ATC CCA AGT TTG AG-3´

Der 50 µl-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

5 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
1 µl	SL1-GSP (50 µM)
1 µl	SL1-Primer (50 µM)
1 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
1 µl	Advantage™ II Polymerase Mix
2,5 µl	doppelsträngige cDNA der L3ni bzw. L3i

Die PCR lief bei folgendem Temperaturprofil ab:

	initiale Denaturierung	94 °C, 1 Minute
40x	Denaturierung	94 °C, 20 Sekunden
	Primerannealing	62 °C, 20 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 3 Minuten
	finale Extension	72 °C, 7 Minuten

Nach der Amplifikationsreaktion erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse, wobei die entstandenen Banden ausgeschnitten und anschließend kloniert und sequenziert wurden (s.3.7.7 bis 3.7.10).

3.14 Überprüfung differentiell transkribierter Sequenzen mittels konventioneller PCR

Die mit Hilfe der bisher angeführten Verfahren als differentiell transkribiert ermittelten Gene der Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten Lungenwurmlarven wurden in einer konventionellen PCR bezüglich ihrer differentiellen Transkription überprüft. Dazu wurden Teilbereiche dieser Gene unter Einsatz der ausgewählten sequenzspezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer (GSP for und GSP rev, s. 9.1) jeweils mit L3ni- und L3i-cDNA amplifiziert und nachfolgend gelelektrophoretisch auf das Vorhandensein von Banden respektive vergleichend auf deren Intensität hin analysiert. In dieser PCR diente sowohl Erstrang- als auch doppelsträngige cDNA der L3ni und L3i als Matrize. Letztere wurde zuvor mit CHROMA SPIN™-100 DEPC Columns (BD CLONTECH, s. 3.8.3) aufgereinigt, um die anschließende Konzentrationsmessung nicht durch noch vorhandene Primer oder dNTPs zu verfälschen. Diese erfolgte, da in der PCR annähernd gleiche Mengen doppelsträngiger L3i- und L3ni-cDNA als Template eingesetzt werden sollten. Die Reaktionsansätze enthielten die unten aufgeführten Komponenten:

2,5 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
1 µl	GSP for (50 µM)
1 µl	GSP rev (50 µM)
1 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
0,2 µl	Advantage™ II Polymerase Mix
1 µl	doppelsträngige cDNA der L3ni bzw. L3i

Die PCR lief bei folgendem Temperaturprofil ab:

25x	Denaturierung	95 °C, 10 Sekunden
	Primerannealing	68 °C, 15 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 3Minuten

Des Weiteren erfolgte eine Amplifikation der Erststrang-cDNAs, die auch in der RACE (s. 3.13.3) als Matrize eingesetzt wurden. Bei der Verwendung der 5´-RACE-cDNA als Template, welche aus der mRNA der fünften Isolierung synthetisiert wurde, wurden die Reaktionen wie oben beschrieben angesetzt und durchliefen anschließend das Temperaturprofil der in Kapitel 3.13.2 aufgeführten Touchdown PCR. Der dritte Zyklenabschnitt wurde jedoch 25-mal durchlaufen, so dass insgesamt 35 Zyklen resultierten. Eine weitere Reaktion wurde als 50 µl-Ansatz mit entsprechend auf 5 µl erhöhtem Volumen an 10x Advantage™ 2 PCR Puffer und 30 Zyklen in der Touchdown PCR durchgeführt. In die genspezifische Amplifikation der 3´- respektive 5´-RACE-cDNA, generiert aus der mRNA der Isolierung 3, ging jeweils ein 50 µl-Reaktionsansatz mit 1,5 µl L3ni- respektive L3i-Template ein. Die Amplifikation erfolgte wiederum als Touchdown PCR mit insgesamt 30 Zyklen.

3.15 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mit ausgewählten differentiell transkribierten Sequenzen der Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten *D. viviparus*-Larven wurde eine quantitative real-time PCR (qPCR) zur Ermittlung der Transkriptionsrate in den beiden Larvenpopulationen auf der Grundlage von Erststrang-cDNA durchgeführt.

In der qPCR erfolgt in einem geschlossenen Gefäß, wodurch die Kontaminationsgefahr deutlich gesenkt wird, neben der Amplifikation auch eine Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Detektion und Quantifizierung geschehen dabei durch Messung von Fluoreszenzemission. Hierfür nutzt die qPCR unter anderem fluoreszenzmarkierte Sonden sowie die 3´→ 5´-Exonukleaseaktivität der *Thermus aquaticus* (*Taq*)-DNA Polymerase. Diese spaltet während der Extensionsphase vom 5´-terminalen Ende doppelsträngiger DNA Nukleotide ab und setzt dabei Mono- und Oligonukleotide frei (HOLLAND et al. 1991). Bei den *TaqMan*™-Sonden handelt es sich um an beiden Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden, die zu einem internen Bereich des PCR-Amplifikats komplementär sind. Am 3´-Ende der Sonde, welches infolge bestimmter Modifikationen keiner Extension durch die *Taq*-Polymerase unterliegt, befindet sich ein so genannter Quencherfarbstoff. Dieser unterdrückt bei intakter Sonde im Zuge des Fluoreszenzenergietransfers die emittierte Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffs, welcher kovalent an das 5´-Ende der Sonde

des Reporterfarbstoffs, welcher kovalent an das 5´-Ende der Sonde gebunden ist. Wird diese durch die 3´→ 5´-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert, kann der Quencherfarbstoff auf Grund der räumlichen Trennung zum Reporterfarbstoff dessen emittierte Fluoreszenzenergie nicht mehr unterdrücken, wodurch ein messbares Signal entsteht (s. Abb. 11). Die *Taq*-Polymerase hydrolysiert dabei nur korrekt angelagerte Sonden, was die besondere Spezifität der qPCR bedingt. Liegen Basen-Fehlpaarungen zwischen der Matrize und Sonde vor, wird diese von der *Taq*-Polymerase verdrängt bevor sich deren 3´→ 5´ Exonukleaseaktivität entfaltet. Eine spezielle Form der *TaqMan*™-Sonden stellen die *TaqMan*™-Minor Groove Binder (MGB)-Sonden dar. MGB (z.B. Dihydrocyclopyrroloindol) sind halbmondförmige Moleküle, welche sich in die kleine Kurve doppelsträngiger DNA falten. Daher bilden Oligonukleotid-MGB-Konjugate hyper-stabile Duplexes mit komplementärer DNA, was eine Erhöhung der Schmelztemperatur bedingt. Dies erlaubt die Nutzung kürzerer Sonden mit folglich effizienterer Fluoreszenzunterdrückung und somit erhöhter Sensitivität. Zudem hybridisieren sowohl 5´- als auch 3´-MGB-konjugierte Oligonukleotide mit höherer Spezifität an die DNA als nicht modifizierte Oligonukleotide, insbesondere dann, wenn sich die Basen-Fehlpaarung im Bindungsbereich des MGB befindet (AFONINA et al. 1996; KUTYAVIN et al. 1997; KUTYAVIN et al. 2000).

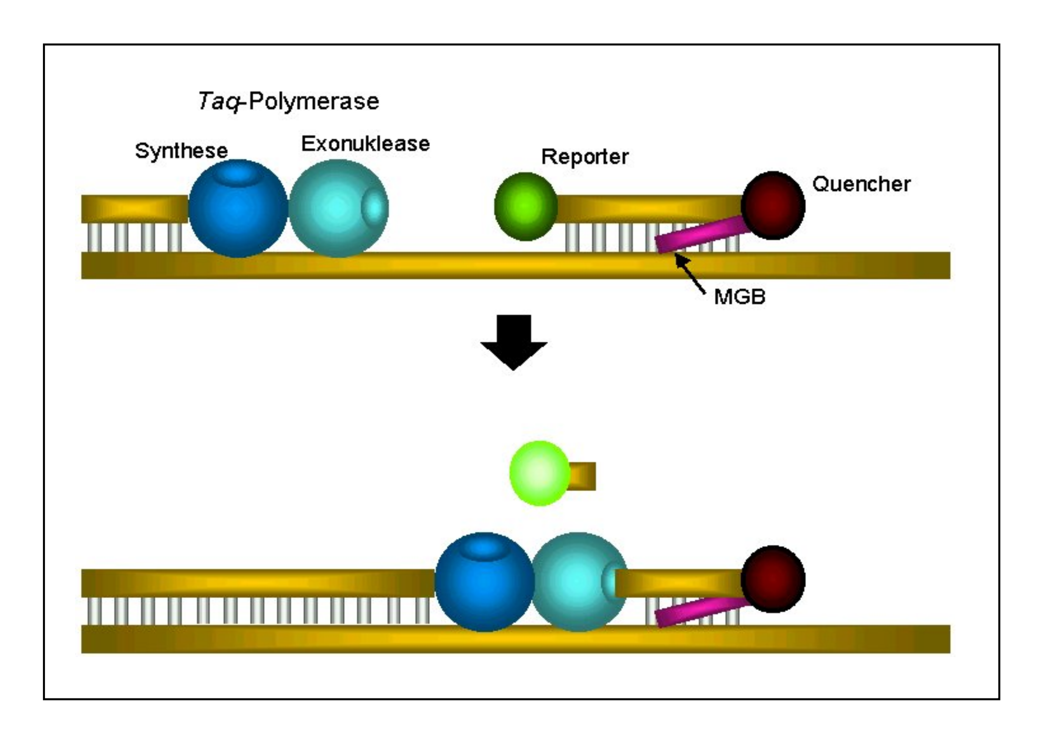


Abb. 11: Prinzip der qPCR mit TaqMan™- bzw. TaqMan™-MGB-Sonden

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl TaqMan™-Sonden als TaqMan™-MGB-Sonden eingesetzt. Die übrigen für die Reaktionsansätze benötigten Reagenzien stammten aus dem Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit (STRATAGENE). Die Reaktionen erfolgten in einem Fluoreszenzdetektor mit integriertem Thermocycler, dem Mx4000™ Multiplex QPCR System (STRATAGENE), mit der dazugehörigen Software (Version 3.01) erfolgte die Auswertung der qPCR. In den verschiedenen Läufen wurde ebenfalls ein so genanntes *house-keeping*-Gen, welches in den einzelnen Proben in relativ konstanter Menge vorliegt, amplifiziert und quantifiziert. Dieses *housekeeping*-Gen, als welches der Elongationsfaktor 1α gewählt wurde, ermöglicht eine Normalisierung und damit einen Vergleich der Transkriptionsraten der zwei Larvenpopulationen.

3.15.1 Charakterisierung zweier *housekeeping*-Gene von *D. viviparus*

Da beim bovinen Lungenwurm kein zur Normalisierung der Transkriptionsraten der L3ni und L3i benötigtes *housekeeping*-Gen bekannt war, musste zunächst ein solches charakterisiert werden. Daher erfolgte mit Hilfe degenerierter Vorwärts- und Rückwärtsprimer, deren Design auf der Grundlage bereits veröffentlichter Sequenzen der Organismen *H. contortus* (BM138861; BM138956; BF423011), *O. ostertagi* (BG924168; BG734046), *Onchocerca volvolus* (M64333), *A. suum* (BI594745) und *C. elegans* (NM_076922.1) basierte, die Charakterisierung eines Fragments des Elongationsfaktors 1α (EF-1α). Ein Sequenzabschnitt des β-Tubulin-Gens (β-Tubulin) sollte mit den degenerierten Primern BTN1 und BTI2 (PAPE 1999) amplifiziert werden.

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
EF-1α for.:	5´-CAT ATH AAY ATY GTY GTB ATY GG-3´	
EF-1α rev.:	5´-CAT RTT CTT RAT GAA RTC ACG-3´	
BTN1:	5´-GGI CAR TGY GGN AAY CAR AT-3´	PAPE, 1999
BTI2:	5´-GAY TGY YTI CAR GGN TTY CA-3	

Abb. 12: Primerkombinationen zur Amplifikation der EF-1α- und β-Tubulin-Fragmente

Für die Amplifikation eines Sequenzabschnitts des β-Tubulin-Gens bzw. EF-1α wurden folgende 50 µl-Reaktion angesetzt:

5 µl	GeneAmp™ 10x PCR Puffer II (PERKIN ELMER)
3 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
1 µl	dNTP Mix (je 2 mM)
0,5 µl	Vorwärtsprimer (500 µM)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (500 µM)
0,25 µl	AmpliTaq Gold™ Polymerase (5 U/µl) (PERKIN ELMER)
1 µl	doppelsträngige cDNA der L3ni bzw. L3i

Die PCRs erfolgten bei unten stehendem Temperaturprofil:

	Aktivierung der Polymerase	95 °C, 10 Minuten
36x	Denaturierung	94 °C, 1 Minute
36x	Primerannealing	46 °C (β-Tubulin) bzw. 42 °C (EF-1α) 1 Minute
36x	Primerextension	72 °C, 1 Minute
	finale Elongation	72 °C, 10 Minuten (nur β-Tubulin)

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel geladen und die entstandenen Banden der erwarteten Fragmentlängen der L3ni- und L3i-cDNA kloniert. Jeweils ein Klon der L3ni und zwei Klone der L3i wurden sequenziert und mittels BLAST (NCBI) mit publizierten Gensequenzen anderer Organismen verglichen (s. Kapitel 3.7.7 bis 3.7.10).

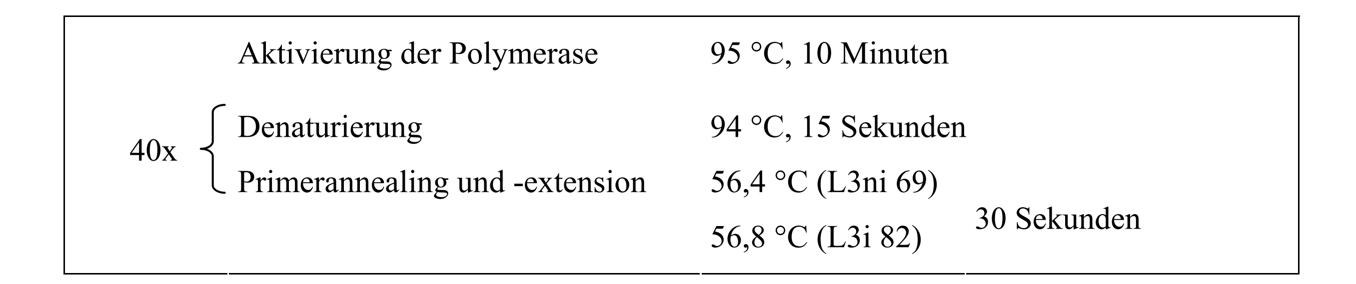
3.15.2 Überprüfung der L3ni 69/92 und L3i 82/101 mittels konventioneller PCR

In diesem Vorversuch zur qPCR erfolgte eine Amplifikation der 5´-RACE-cDNAs (synthetisiert aus mRNA-Isolierung 5) der zwei Larvenpopulationen, mit den jeweiligen Primern für die qPCR (s. 3.15.5) der Sequenzen L3ni 69/92 und L3i 82/101. In dieser konventionellen PCR wurde der in der qPCR genutzte Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit (STRATAGENE) verwendet.

Folgende Komponenten waren in den 25 µl-Reaktionsansätzen enthalten:

2,5 µl	10x Core PCR Puffer
1 µl	dNTP Mix (je 5 mM)
1 µl	$MgCl_2$ (50 mM)
1 µl	SOD for bzw. NMT for (50 µM)
1 µl	SOD rev bzw. NMT rev (50 µM)
0,5 µl	SureStart™ *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
2 µl	5´-RACE-cDNA der L3ni bzw. L3i

Die Amplifikationsreaktion lief bei folgendem Temperaturprofil ab:



	Aktivierung der Polymerase	95 °C, 10 Minuten	
40x	Denaturierung	94 °C, 15 Sekunden	
	Primerannealing und -extension	56,4 °C (L3ni 69) 56,8 °C (L3i 82)	30 Sekunden

Nach Ablauf der PCR wurden die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch auf Intensitätsunterschiede der Banden bezüglich der zwei cDNA-Populationen hin untersucht.

3.15.3 Synthese der Erststrang-cDNA

Von den beiden Larvenpopulationen wurden je zwei Erststrang-cDNAs für den Einsatz als Matrize in der quantitativen real-time PCR synthetisiert, wobei jeweils etwa gleiche Mengen an mRNA in die Umschreibung eingingen. Aus insgesamt 751 µg bzw. 378 µg isolierter L3ni-mRNA und 377 µg bzw. 753 µg isolierter L3i-mRNA (Isolierung 6, s. 4.2) wurde, wie in Kapitel 3.13.3 beschrieben, cDNA mittels des 3´-CDS Primer und des SMART II A Oligonukleotid (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, BD CLONTECH) hergestellt. Diese werden im Kapitel 4.11.4 als Erststrang-cDNA 1 respektive 2 bezeichnet. Außerdem wurden noch drei weitere Erststrang-cDNAs, welche bereits in der RACE Verwendung fanden, als Template eingesetzt.

3.15.4 Erstellung von Standardreihen

Um Aussagen über die Kopienzahl der Transkripte in den beiden Larvenpopulationen und die Sensitivität der qPCR treffen zu können, wurden Standardreihen für die zu untersuchenden Gensequenzen (L3ni 69/92, L3i 82/101 und EF-1α) erstellt. Dies erfolgte in Form einer Verdünnungsreihe der in den pCR™4-TOPO™ Vektor (INVITROGEN) klonierten DNA mit 10^7 bis 10^0 Kopien pro Reaktionsansatz.

3.15.5 qPCR mit TaqMan™-Sonden

Die TaqMan™-Sonden sowie dazugehörige Primer für die Gensequenzen der L3ni 69/92 (SOD), L3i 82/101 (PNMT) und EF-1α wurden mit dem Softwareprogramm Beacon Designer (PREMIER BIOSOFT) ausgewählt. Die Synthese dieser Oligonukleotide wurde sowohl bei der Firma APPLIED BIOSYSTEMS als auch QIAGEN OPERON in Auftrag gegeben. Als Quencherfarbstoff am 3´-Ende der Sonden diente stets TAMRA, als Reporterfarbstoff am 5´-Ende wurde für die EF-1α-Sonde zunächst HEX gewählt, um eine Multiplex-PCR mit der FAM-markierten Sonde für die L3ni 69/92 bzw. L3i 82/101 zu ermöglichen. Die Verwendung dieses Fluoreszenzfarbstoffs erwies sich jedoch als ungeeignet für eine zuverlässige Detektion, so dass im weiteren Verlauf der Arbeit eine ebenfalls FAM-markierte EF-1α-Sonde verwendet wurde.

Bezeichnung	Sequenz (5´ → 3´)	T_m
Primer SOD for	ATT ACA CTC AAT GGT TAT CAC AGT	55 °C
Primer SOD rev	GCC CAA TTC CAA GCG TTT AG	55,8 °C
Sonde SOD	6-FAM-TAG ACG ATA CCG ATG ACT CCA CAC GC- TAMRA	65,2 °C
Primer PNMT for	AAT GAT ATT AAC GCA GGA AGG AA	54,8 °C
Primer PNMT rev	TGC AGC AAT ATT CTA CAC AAA AG	54,6 °C
Sonde PNMT	6-FAM- TGT GACAAC GGT ATC AAA CAT CCC TTG G- TAMRA	65 °C
Primer EF-1α for	CGA CTG GTC ATC TCA TCT ACA	54,9 °C
Primer EF-1α rev	TCT AAT ACC CAT GCG TAC TTG A	55,2 °C
Sonde EF-1α-	6-FAM-ACC CTT ACC CAT CTC TTG TGC TTC CTT-TAMRA	65,1 °C

Abb. 13: In der qPCR verwendete Primer und TaqMan™-Sonden (T_m errechnet von der Primerdesign-Software)

Bevor mit der quantitativen Untersuchung begonnen wurde, erfolgte eine Optimierung der qPCR. Hierzu wurde mittels konventioneller PCR durch Anlegen eines Gradienten von 56 °C bis 61 °C (MJ Research Multicycler PTC 200, BIOZYM) die optimale Annealingtemperatur der drei Primerkombinationen analysiert. Des Weiteren wurden im MX 4000™ Multiplex Quantitative PCR System (STRATAGENE) verschiedene Endkonzentration der Sonden (200 nM bis 500 nM) und Primer (25 nM Vorwärts- und 300 nM Rückwärtsprimer sowie beide Primer 300 nM) sowie Annealingtemperaturen (52 °C bis 56 °C) getestet.

In der qPCR wurden, jeweils als Duplikate, die Verdünnungsreihen der Plasmide (10^7 bis 10^0 Kopien/Ansatz) als 25 ul-Reaktionen (Komponentenzusammensetzung s. 3.15.6) eingesetzt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte jeweils in der kombinierten Annealing- und Extensionsphase der unten aufgeführten two-step PCR.

	Aktivierung der Polymerase	95 °C, 10 Minuten
40x	Denaturierung	94 °C, 20 Sekunden
	Primerannealing und -extension	52 °C, 1 Minute

3.15.6 qPCR mit TaqMan™-MGB-Sonden

Da sich die qPCR mit TaqMan™-Sonden als schlecht reproduzierbar herausstellte, wurden zur weiteren Durchführung TaqMan-MGB-Sonden eingesetzt. Als Reporterfarbstoff am 5´-Ende der Sonden diente FAM. Am 3´-Ende der Sonden befand sich neben einem nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) respektive *dark* Quencher auch der MGB. Das Design dieser Sonden und der zugehörigen Primer erfolgte mit dem Softwareprogramm Primer Express™ der Firma APPLIED BIOSYSTEMS. Die Synthese der Sonden wurde bei APPLIED BIOSYSTEMS in Auftrag gegeben, die Primersynthese erfolgte bei der Firma INVITROGEN.

Bezeichnung	Sequenz (5´ → 3´)	T_m
Primer SOD-MGB for	TGG ACG AGC CGT TGT CAT T	59 °C
Primer SOD-MGB rev	TTA GGC CTT GGC AGA TCG G	60 °C
Sonde SOD-MGB	6-FAM-ATG CCG ATG CAG ATG A-MGBNFQ	69 °C
Primer PNMT-MGB for	CCA CAA AAT CGC CAA GAG CTA	59 °C
Primer PNMT-MGB rev	TTC GAG TTT TGA TTG GTC CCA	59 °C
Sonde PNMT-MGB	6-FAM-TGC GGT GGT ATG AGG GA-MGBNFQ	70 °C
Primer EF-1α-MGB for	GGT GGG ATT GAC AAA AGA ACC A	60 °C
Primer EF-1α-MGB rev	CAA GAG ATG GGT AAG GGT TCT TTC	58 °C
Sonde EF-1α-MGB	6-FAM-TGA AAA ATT TGA GAA GGA AGC-MGBNFQ	69 °C

Abb. 14: **In der qPCR verwendete Primer und TaqMan™-MGB-Sonden** (T_m errechnet von der Primerdesign-Software)

Die zu untersuchenden L3ni- und L3i-cDNAs, Plasmid-Verdünnungsreihen sowie Negativkontrollen wurden jeweils als Duplikate eingesetzt. In den einzelnen Läufen wurden die Transkriptionsraten des EF-1α in Verbindung mit der L3ni 69/92 oder L3i 82/101 bzw. beiden Sequenzen in den jeweiligen L3ni- und L3i-cDNAs analysiert. Diese Transkriptionsraten wurden in je fünf verschiedenen Erststrang-cDNAs der L3ni und L3i überprüft. Dabei wurden die Erststrang-cDNAs in den einzelnen Läufen sowohl unverdünnt, 10fach und 100fach verdünnt als Matrize eingesetzt. In den qPCRs wurden Primer und Sonde in einer Endkonzentration von je 300 nM, der Referenzfarbstoff ROX in einer Endkonzentration von 25 nM eingesetzt. Die Stocklösung des Referenzfarbstoffs (1 mM) wurde durch die Zugabe von 179 µl Ampuwa™ und 20 µl 10x Core PCR Puffer zu 1 µl ROX zunächst auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. Die 25 µl-Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

2,5 µl	10x Core PCR Puffer
1 µl	dNTP Mix (je 5 mM)
2,78 µl	$MgCl_2$ (50 mM)
0,75 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
0,75 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
0,15 µl	Sonde (50 µM)
0,38 µl	Referenzfarbstoff ROX (5 µM)
0,13 µl	SureStart™ *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
1 µl	Erststrang-cDNA

Um Pippetierungenauigkeiten bei den Duplikaten weitestgehend zu vermeiden, wurden zunächst mittels einer automatischen Mehrkanalpipette (Matrix Impact2™, APOGENT DISCOVERIES) 52,8 µl Mastermix mit 2,2 µl Template vermischt und davon je 25 µl in ein separates Reaktionsgefäß gegeben. Bevor die Ansätze in das Gerät verbracht wurden, erfolgte eine kurze Zentrifugation, um die durch den Deckel der Reaktionsgefäße verlaufende Fluoreszenzmessung, die jeweils in der Annealingphase der Reaktion stattfand, nicht durch anhaftende Mikrotröpfchen zu beeinträchtigen. Das von dem Softwareprogramm Primer Express™ (APPLIED BIOSYSTEMS) angegebene Temperaturprofil fand Anwendung, allerdings wurde die Annealingzeit von 20 Sekunden auf 24 Sekunden verlängert.

	Schritt	Bedingungen
	Aktivierung der Polymerase	95 °C, 10 Minuten
40x	Denaturierung	94 °C, 20 Sekunden
	Primerannealing	55 °C, 24 Sekunden
	Primerextension	72 °C, 30 Sekunden

Die Analyse der qPCR erfolgte mittels der normalisierten, Baseline-korrigierten Fluoreszenz (dRn), wobei die Optionen „adaptive baseline“ und „treat individually“ angewendet wurden. Dabei fand eine absolute Quantifizierung der L3ni 69/92-, L3i 82/101- und EF-1α-Kopienzahlen anhand der eingesetzten Standardreihen statt. Mit den jeweils ermittelten Kopienzahlen konnte berechnet werden, wie viele L3ni 69/92- bzw. L3i 82/101-Kopien auf eine EF-1α-Kopie entfallen. Auch erfolgte für die einzelnen Proben eine Auswertung der Cycle threshold (Ct)-Werte, welche der relativen Quantifizierung dienen sollten. Bei dieser Quantifizierungsmethode werden die jeweilige Templatemengen in Relation zu einem Kalibrator (cb) gesetzt. Dieser wird beispielsweise im Fall der L3ni 69/92 vom Ct-Mittelwert der einzelnen Läufe unter Verwendung eines der L3ni-Templates repräsentiert. Die jeweiligen sich mit den übrigen L3ni- sowie L3i-Templates ergebenden Ct-Mittelwerte werden auf diesen Kalibrator bezogen, wodurch eine relative Erhöhung bzw. Senkung der Transkriptionsrate ermittelt werden kann. Diese Berechnungen erfolgen nach der Normalisierung auf eine endogene Referenzsequenz (EF-1α) nach folgender Formel:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dabei gilt: $\Delta Ct = Ct_{\text{L3ni 69/92 bzw. L3i 82/101}} - Ct_{\text{EF-1}\alpha}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{L3ni 69/92 bzw. L3i 82/101}} - \Delta Ct_{\text{cb}}$

Voraussetzung für die relative Quantifizierung ist jedoch eine annähernd gleiche PCR-Effizienz der Ziel- und Referenzsequenz. Hierzu erfolgte für die jeweiligen Standardreihen eine Berechnung der ΔCt-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen. Bei der graphischen Darstellung der ΔCt-Werte einer Verdünnungsstufe überschreitet die Steigung der angelegten Geraden im Falle einer äqualen PCR-Effizienz nicht den Wert von 0,1.

Die statistische Auswertung der qPCR Ergebnisse wurde mit dem Computerprogramm SigmaStat Version 2.0 (JANDEL SCIENTIFIC, San Rafael, USA) durchgeführt. Im Anschluss an die Überprüfung auf Normalverteilung mit Kolmogorov-Smirnov erfolgte die Berechnung eventueller signifikanter Korrelationen unter Verwendung des t-Tests respektive des Mann-Whitney Rank Sum Tests.

3.16 *daf*- und *age*-1-spezifische PCR

Bei dem ebenfalls zur Entwicklungshemmung befähigten frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* konnten bereits die so genannten *daf*-Gene sowie das Gerontogen *age*-1, welche in den hypobiotischen Prozess involviert sind, identifiziert werden (s. Kapitel 2.3.3 und 2.3.4). Es sollte überprüft werden, ob bei *D. viviparus* Homologe dieser Gene existieren.

3.16.1 *daf*-, *age*-1-spezifische Primer

Basierend auf den elf publizierten *daf*-Gensequenzen sowie der *age*-1 (*daf*-23) Gensequenz wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Lasergene (DNASTAR) 28 *daf*-spezifische sowie drei *age*-1 spezifische Primerkombinationen (s. 9.5) ausgewählt, wobei die Primerpaare jeweils in einem Exonbereich des entsprechenden Gens lokalisiert waren. Des Weiteren wurden

in der PCR auch bereits publizierte sequenzspezifische Primerpaare für die Gene *daf*-1, *daf*-3, *daf*-4 sowie *age*-1 (nach RICKLING 1999; s. 9.5) eingesetzt. Die Oligonukleotidsynthese der insgesamt 35 Primerkombinationen erfolgte im Auftrag durch die Firma INVITROGEN.

3.16.2 Amplifikation genomischer DNA

Mittels der 35 sequenzspezifischen Primerpaare für die *C. elegans daf*-Gene und das Gerontogen *age*-1 erfolgte die Amplifikation genomischer DNA adulter Lungenwürmer. Die 50 µl-Doppelansätze enthielten folgende Komponenten:

5 µl	10x PCR Puffer
1,5 µl	$MgCl_2$ (50 mM)
1 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
1 µl	Vorwärtsprimer (50 µM)
1 µl	Rückwärtsprimer (50 µM)
0,25 µl	*Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
2 µl	genomische DNA

Die PCRs fanden bei dem unten aufgeführte Temperaturprofil statt, wobei die unter 9.5 angegebenen Annealingtemperaturen meist den von der Primerdesign-Software (Lasergene, DNASTAR) errechneten Temperaturen entsprachen, in einigen Reaktionen ergaben sich jedoch diesbezüglich Differenzen von ± 0,2 °C.

	initiale Denaturierung	94 °C, 3 Minuten
35x	Denaturierung	94 °C, 1 Minute
	Primerannealing	x °C, 1 Minute
	Primerextension	72 °C, 1 Minute
	finale Elongation	72 °C, 10 Minuten

Nach der Amplifikationsreaktion unterlagen die PCR-Produkte einer Gelelektrophorese. Banden, welche in etwa die erwartete Fragmentlänge aufwiesen oder sich besonders prominent

darstellten, wurden kloniert und sequenziert. Der Identitätsvergleich mit publizierten Sequenzen anderer Organismen erfolgte mittels BLASTN (s. Kapitel 3.7.7 bis 3.7.10).

3.16.3 Überprüfung der Sequenzen *daf*-12-o und *daf*-16A-u

Da es sich bei dem Template der *daf*-spezifischen PCR um genomische DNA adulter Parasiten handelte, welche aus Rinderlungen gewonnenen wurden, bestand die Gefahr der Verunreinigung mit Wirtszell-DNA. Daher sollten zwei Gensequenzen, die mit den Primerpaaren *daf*-12 bzw. *daf*-16A synthetisiert wurden und im BLASTN signifikante Identitäten zeigten, unter Verwendung genomischer DNA dritter *D. viviparus*-Larven amplifiziert werden, um die mit genomischer DNA adulter Lungenwürmer erhaltenen Sequenzen zu verifizieren.

3.16.3.1 Isolierung genomischer DNA

In die Präparation genomischer DNA mit Hilfe des NucleoSpin™ Tissue Kit (MACHEREY & NAGEL) gingen je 20 000 L3ni bzw. L3i ein. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Schritte nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Lyse des eingesetzten Gewebes erfolgte mittels einer Proteinase K/SDS-Lösung. Daran anschließend wurden durch die Zugabe chaotroper Salze sowie Ethanol zur Fällung der DNA geeignete Voraussetzungen für die Bindung der genomischen DNA an eine Silica-Membran geschaffen. Zur Beseitigung von Proteinen und sonstigen Kontaminanten schlossen sich zwei Waschschritte mit verschiedenen Puffern an, bevor die genomische DNA zweimal mit je 50 µl auf 70 °C vorgewärmtem autoklavierten Aqua bidest. eluiert wurde.

3.16.3.2 Primerdesign

Basierend auf den ermittelten Gensequenzen *daf*-12-o und *daf*-16A-u wurden mit dem Softwareprogramm Lasergene (DNASTAR) Primer mit unten aufgeführter Sequenz ausgewählt, die neben den Primerpaaren *daf*-12 und *daf*-16A der Verifizierung dienen sollten.

daf-12RNA for.:	5´-AAA AAC CTA GCA GCG AGT G-3´
daf-12RNA rev.:	5´-GGC CCA TAA CCC AGA GG-3´
daf-16prp for.:	5´-TTC TCC ATT GCT GCT TTG TA-3´
daf-16prp rev.:	5´-CTA GTG AGA TGG ATG AAT-3´

Abb. 15: Primer zur Überprüfung der Sequenzen *daf*-12-o und *daf*-16A-u

3.16.3.3 Sequenzspezifische PCR

Die Amplifikation genomischer DNA der L3ni und L3i erfolgte jeweils mit den Primerpaaren *daf*-12, *daf*-12RNA, *daf*-16A und *daf*-16prp. In den 25 µl-Reaktionsansätzen waren folgende Komponenten enthalten:

2,5 µl	10x Advantage™ 2 PCR Puffer
1 µl	dNTP Mix (je 10 mM)
1 µl	Vorwärtsprimer (50 µM)
1 µl	Rückwärtsprimer (50 µM)
0,25 µl	Advantage™ 2 Polymerase Mix
2 µl	genomische DNA

In dieser PCR fand folgendes Temperaturprofil Anwendung:

	initiale Denaturierung	94 °C, 3 Minuten	
35x	Denaturierung	94 °C, 45 Sekunden	
	Primerannealing	47,8 °C bei den *daf*-12 Kombinationen 42,5 °C bei den *daf*-16 Kombinationen	1 Minute
	Primerextension	68 °C, 1 Minute	

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben im Agarosegel analysiert. Bei zwei Banden, die mit Hilfe des Primerpaares *daf*-16prp amplifiziert wurden, erfolgte eine weitere Charakterisierung wie unter 3.7.7 bis 3.7.10 beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Parasitologisches Probenmaterial

4.1.1 Überlebensrate der Larven nach Induktion der Entwicklungshemmung

Durch Auszählung der lebenden dritten *D. viviparus*-Larven vor und nach der sechs- bis achtwöchigen Kühlung bei 4 °C wurde der Prozentsatz der überlebenden Lungenwurmlarven berechnet. Die Überlebensrate schwankte zwischen 33 % und 75,8 % bei einem Mittelwert von 55,5 % überlebender Larven.

4.1.2 Überprüfung der Hypobiosefähigkeit des Laborstammes

Das mit insgesamt 3000 nicht Hypobiose induzierten Larven (L3ni) infizierte Kalb 1 wurde am 27. Tag *p.i.* getötet und seziert. Aus der eröffneten Trachea und den Bronchien konnten 425 adulte Lungenwürmer mit einer Länge von ca. 3 cm bis 7 cm entnommen werden.

Kalb 2 und 3 wurden mit insgesamt 20 000 Hypobiose induzierten Larven (L3i) infiziert. Tötung und Sektion von Kalb 2 erfolgten wie bei Kalb 1 am 27. Tag *p.i.* Die Lungenperfusion erbrachte 317 gehemmte Larven mit einer Länge von 0,45 mm bis 1,13 mm, zwei Stadien erwiesen sich als ca. 3 mm lang. Bei Kalb 3 ergab die Lungenperfusion 42 Tage *p.i.* eine Ausbeute von 94 ca. 1 mm bis 1,5 mm langen und fünf ca. 3 mm langen gehemmten Lungenwurmstadien, die Anlage einer Bursa copulatrix war bei elf Individuen erkennbar.

Zum Sektionszeitpunkt konnte bei Kalb 1 in 2x 5 g Kot eine Ausscheidung von 23 bzw. 86 *D. viviparus*-Larven festgestellt werden, Kalb 2 schied keine Larven aus. Bei Kalb 3 fanden sich zum Zeitpunkt der Sektion in 2x 10 g Kot eine respektive drei Lungenwurmlarven.

4.2 Quantitative Bestimmung und Reinheit der isolierten mRNA

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde für verschiedene Untersuchungen insgesamt sechsmal mRNA aus den L3ni und L3i isoliert. Das Gewicht des in die mRNA-Isolierung

eingesetzten Larvenmaterials betrug dabei 60 mg bis 100 mg. Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Messung sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Isolierung Nr.	**Anzahl L3**	**Reinheit**	**Gesamtmenge der mRNA in ng**
1	470 000 L3ni 485 000 L3i	1,794 1,707	1075 1344
2	500 000 L3ni 500 000 L3i	1,170 1,197	2820 3580
3	520 000 L3ni 500 000 L3i	1,566 1,567	666 1500
4	500 000 L3ni 500 000 L3i	1,262 1,254	4250 1780
5	250 000 L3ni 250 000 L3i	1,169 1,197	3040 3520
6	345 000 L3ni 376 000 L3i	1,110 1,243	2905 1757

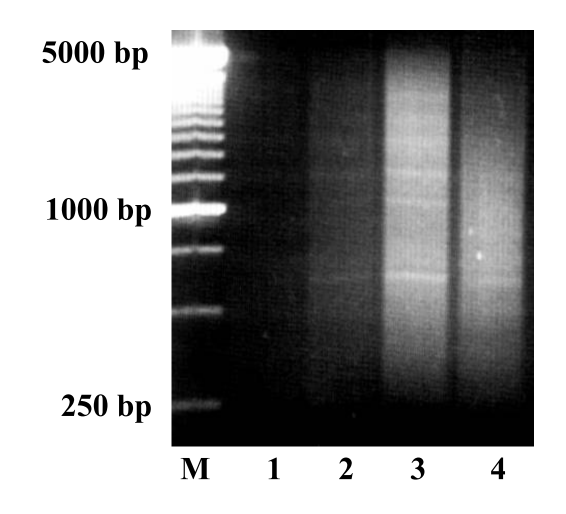
Tab. 1: mRNA-Isolierung aus dritten *D. viviparus*-Larven

4.3 Suppression Subtractive Hybridization

4.3.1 Bestimmung der optimalen Anzahl an PCR-Zyklen und LD PCR

Um die zur Durchführung der SSH benötigten Tester- und Driver-cDNAs herzustellen, wurde mRNA der L3ni, L3i sowie der HSM-Kontrolle einer reversen Transkription unterzogen. Bei der anschließenden Bestimmung der optimalen LD PCR-Zyklenzahl stellten sich 21 Zyklen als optimal für eine Amplifikation von cDNA mit guter Qualität heraus.

Die jeweils im Doppelansatz synthetisierte cDNA der L3ni, L3i und HSM-Kontrolle wies einen Längenbereich von 250 bp bis 5000 bp auf. Die unten stehenden Abbildungen zeigen beispielhaft die Ergebnisse dieser Arbeitsschritte.



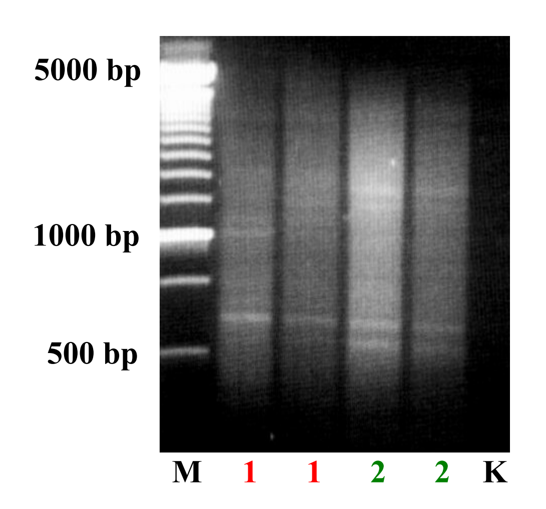


Abb. 16: Bestimmung der optimalen Zyklenzahl mit L3i-cDNA und LD PCR

1,2 %iges Agarosegel
M: 250 bp DNA Ladder
1: 15 PCR-Zyklen
2: 18 PCR-Zyklen
3: 21 PCR-Zyklen
4: 24 PCR-Zyklen

1,2 %iges Agarosegel
M: 250 bp DNA Ladder
1: L3i-cDNA
2: L3ni-cDNA
K: Negativkontrolle

4.3.2 Gelanalyse der mittels Säulenchromatographie aufgereinigten cDNA-Proben

In die Säulenchromatographie gingen jeweils zwei Ansätze der mit n-Butanol auf ein Volumen von ca. 60 µl eingeengten cDNAs der L3ni, L3i und HSM ein. Die sich anschließende Gelanalyse der je zwei Eluatfraktionen diente der Abschätzung der Wiederfindungsrate der cDNA, wobei wie erwartet 50 % in der ersten Eluatfraktion vorgefunden wurden. In der zweiten Eluatfraktion lag auf Grund der Größenfraktionierung cDNA mit insgesamt geringerer Länge vor. Da aber eine höhere cDNA-Ausbeute als im ersten Eluat festzustellen war, wurden die beiden Eluate für den nachfolgenden Restriktionsenzymverdau zusammengeführt.

4.3.3 Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I

Durch diesen Enzymverdau wurden die für die Adapterligation benötigten glatten Enden geschaffen und die im Zuge der cDNA-Synthese inkorporierten Oligonukleotidsequenzen abgespalten. Nach dem *Rsa*I-Verdau zeigen die cDNA-Fragmente einen Wechsel in der Größenverteilung von ca. 200 bp bis 5000 bp auf nunmehr 100 bp bis 2000 bp. Des Weiteren konnten die im Restriktionsenzymverdau abgespaltenen Oligonukleotide jeweils in Form einer schwachen Bande dargestellt werden.

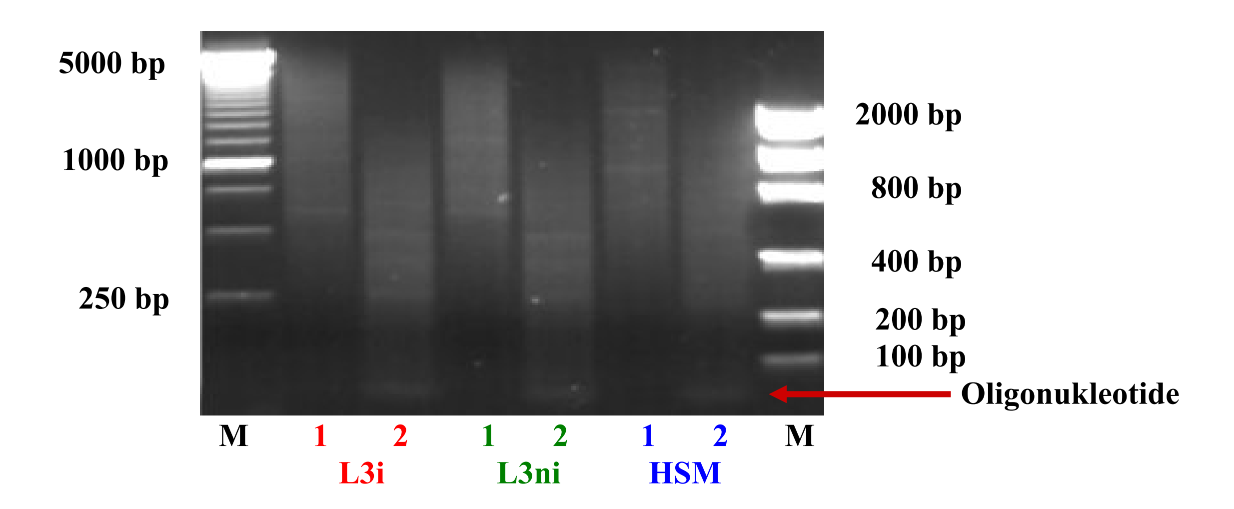


Abb. 17: Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I

1,2 %iges Agarosegel

M: 250 bp DNA Ladder, Low DNA MASS™ Ladder

1: unverdaute cDNA

2: verdaute cDNA

4.3.4 Gelanalyse der extrahierten und aufgereinigten Proben

Die cDNA-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie bedingte eine Entfernung sämtlicher cDNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 100 bp. Wie aus Abb. 18 ersichtlich, ist die in Abb. 17 erkennbare Bande der Oligonukleotide nicht mehr vorhanden.

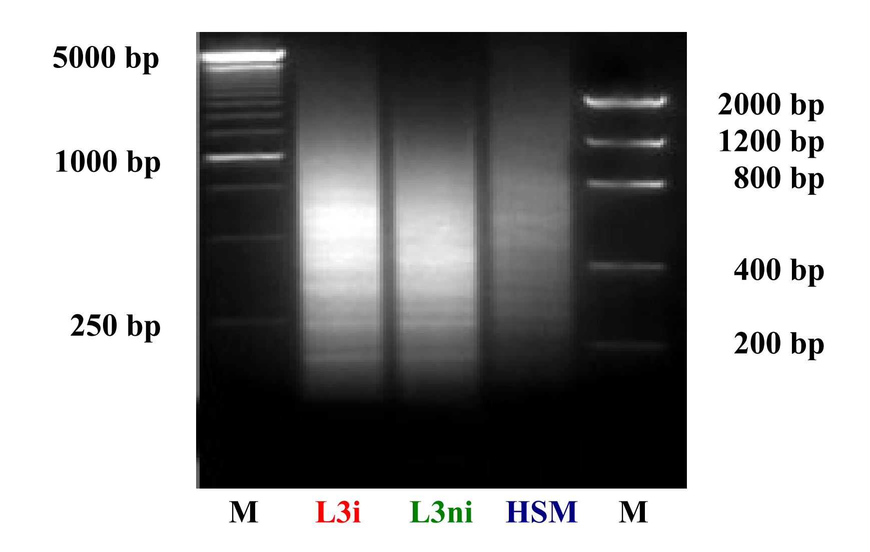


Abb. 18: Nach Restriktionsenzymverdau aufgereinigte cDNA
1,5 %iges Agarosegel
M: 250 bp DNA Ladder, Low DNA MASS™ Ladder

4.3.5 Konzentrationsbestimmung der cDNA-Lösung

Durch eine photometrische Konzentrationsmessung konnte bestätigt werden, dass die L3ni-, L3i- und HSM-cDNA nach der Ethanolfällung eine für die Adapterligation erforderliche Konzentration von mindestens 300 ng/µl aufwies:

cDNA	Konzentration	Reinheit
L3ni	499,5 ng/µl	1,765
L3i	956,5 ng/µl	1,798
HSM	323 ng/µl	1,753

4.3.6 Analyse der Adapterligationseffizienz

Durch Intensitätsvergleich der entstandenen Banden bei Verwendung eines genspezifischen Primerpaares (GSP for und GSP rev) sowie der Kombination aus genspezifischen Rückwärts-

primer (GSP rev) und dem an die komplementäre Adaptersequenz bindenden PCR Primer 1 sollte sichergestellt werden, dass mindestens 25 % der cDNAs der jeweiligen Ligationsansätze an beiden 5´-Enden Adapter tragen. Sowohl bei Durchführung 1 als auch bei Durchführung 2 ergab sich folgendes: Mit dem GSP rev und PCR Primer 1 erschienen bei der HSM-cDNA drei statt der erwarteten einen Bande im Gel, was auf einen unvollständigen Enzymverdau zurückzuführen war. Diese Primerkombination ergab bei der Larven-cDNA regelmäßig einen „Schmier“ mit darin erkennbaren Banden. Die Amplifikation mit dem genspezifischen Primerpaar ließ erst nach Ablauf fünf weiterer PCR-Zyklen ein im Gel sichtbares Produkt entstehen (nicht dargestellt). Dabei erschien jedoch nicht nur eine Bande bei gut 200 bp, wie sie in Vorversuchen erzielt wurde, sondern ein multiples Bandenmuster. Dieses entsprach dabei dem in Vorversuchen festgestellten Bandenmuster bei abgesenkter Annealingtemperatur. Insgesamt konnte bei allen analysierten Proben auf eine gute Ligationseffizienz geschlossen werden.

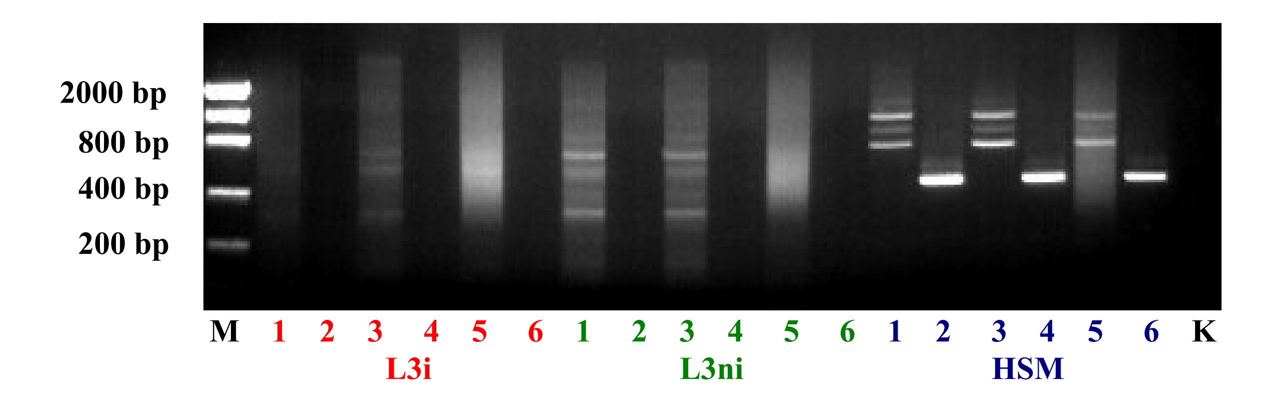


Abb. 19: Analyse der Ligationseffizienz

2 %iges Agarosegel

M: Low DNA MASS™ Ladder

1, 3, 5:	PCR Primer 1 und GSP rev	1,2:	Adapter1-ligierte cDNA
2, 4, 6:	GSP for und GSP rev	3,4:	Adapter 2R-ligierte cDNA
K:	Negativkontrolle	5,6:	Tester-Kontrolle

4.3.7 Suppression PCR

Bei erfolgreicher Unterdrückung der Amplifikation von Hybridmolekülen mit identischen Adaptern an den 5`-Enden sollte das im Agarosegel sichtbare Bandenmuster der subtrahierten Kontroll-DNA bei der subtrahierten HSM-cDNA ebenfalls erkennbar sein. Tatsächlich konnten in dem entstandenen „Schmier“ die meisten dieser Banden, wenn auch in schwächerer Ausprägung als bei der subtrahierten Kontroll-DNA, lokalisiert werden. Das PCR-Produkt der experimentellen subtrahierten cDNAs, die in dieser Arbeit von der L3ni- und L3i-cDNA repräsentiert wurden, erscheint in der gelelektrophoretischen Analyse gewöhnlich als „Schmier“ im Größenbereich von 200 bp bis 2000 bp, in welchem auch distinkte Banden auftreten können. In dem sich über den erwarteten Größenbereich erstreckenden „Schmier“ konnten schwache Banden sowohl in der subtrahierten cDNA der L3ni als auch der L3i festgestellt werden. Auffällig war bei allen drei Populationen, dass die PCR-Produkte der subtrahierten cDNA und der zugehörigen nicht subtrahierten Tester-Kontrolle eine unterschiedliche Größenverteilung aufwiesen, da der „Schmier“ der Tester-Kontrollen jeweils über 2000 bp hinaus sichtbar war. Des Weiteren unterschied sich insbesondere bei den beiden Larvenpopulationen die subtrahierte cDNA-Probe von der zugehörigen Tester-Kontrolle im Bereich zwischen ca. 600 bp und 1200 bp. Hier zeigte die subtrahierte cDNA eine allgemein stärkere Intensität der Amplifikationsprodukte. Zudem war, wie oben beschrieben, auch das Auftreten schwacher Banden erkennbar. Somit konnte von einer erfolgreichen subtraktiven Hybridisierung und Suppression PCR ausgegangen werden. Die beschriebenen Beobachtungen waren bei der Durchführung 2 im Gegensatz zur im Folgenden abgebildeten Durchführung 1 insgesamt weniger deutlich erkennbar.

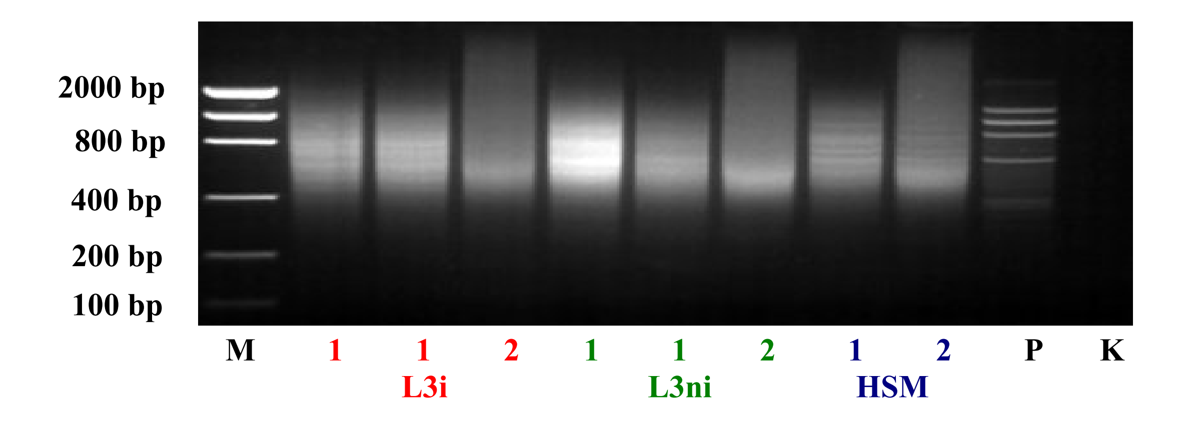


Abb. 20: **Suppression PCR**

2 %iges Agarosegel

M: Low DNA MASS™ Ladder

1: subtrahierte cDNA (Doppelansätze bei L3i und L3ni)

2: nicht subtrahierte Tester-Kontrolle

P: subtrahierte Kontroll-DNA

K: Negativkontrolle

4.3.8 Nested PCR

Nach erfolgter Nested PCR sollte sich das Bandenmuster der subtrahierten HSM-cDNA weiter dem der subtrahierten Kontroll-DNA angleichen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erreicht, vielmehr waren einige der mittels Suppression PCR entstandenen Banden der subtrahierten HSM-cDNA nun nicht mehr im Agarosegel auffindbar. Auch gelang es nicht mehr, die schwachen Banden der jeweiligen Doppelansätze der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA darzustellen. Entgegen der Erwartung, in der gelelektrophoretischen Überprüfung der Amplifikationsreaktion einen noch deutlicheren Unterschied zwischen den subtrahierten Proben und den zugehörigen nicht subtrahierten Tester-Kontrollen als nach der Suppression PCR zu erkennen, glich sich das Bild der jeweiligen Proben weitestgehend an.

4.3.9 Analyse der Subtraktionseffizienz

Die spektrophotometrische Messung des 10fach verdünnten Nested PCR-Produkte (NP) der subtrahierten cDNAs sowie der nicht subtrahierten Tester-Kontrollen (TK) der L3ni und L3i, welche in der PCR zur Überprüfung einer effektiven subtraktiven Hybridisierung als Template dienen sollten, ergab folgende Werte:

Durchführung 1	Konzentration (ng/µl)	Reinheit
L3ni:		
subtrahiertes NP (Ansatz 1)	44	1,708
subtrahiertes NP (Ansatz 2)	48	1,759
Tester-Kontrolle NP	38	1,714
L3i:		
subtrahiertes NP (Ansatz 1)	33	1,739
subtrahiertes NP (Ansatz 2)	47	1,659
Tester-Kontrolle NP	40	1,745
Durchführung 2		
L3ni:		
subtrahiertes NP (Ansatz 1)	29,7	1,737
subtrahiertes NP (Ansatz 2)	42,2	1,737
Tester-Kontrolle NP	32,4	1,705
L3i:		
subtrahiertes NP (Ansatz 1)	47,7	1,698
subtrahiertes NP (Ansatz 2)	47,5	1,715
Tester-Kontrolle NP	34,9	1,396

Nach einer effektiven subtraktiven Hybridisierung sollte die subtrahierte cDNA im Vergleich zu der entsprechenden nicht subtrahierten TK erst nach 5 bis 15 weiteren PCR-Zyklen Banden im Agarosegel erscheinen lassen, wenn eine nicht differentiell transkribierte Sequenz amplifiziert wird. Unter Verwendung der Primerkombination *daf*-1 I for und *daf*-1 rev konnte mit der L3i-TK der **Durchführung 1** nach 33 PCR-Zyklen ein Amplifikationsprodukt im Agarosegel festgestellt werden, dahingegen war bei der subtrahierten L3i-cDNA auch nach 38 Zyklen keine Bande erkennbar, so dass die Differenz zwischen beiden Proben mindestens zehn Zyklen betrug. Die Überprüfung der L3ni-cDNA ergab bei der TK nach 28 Zyklen eine

Bande, welche in geringerer Intensität erst nach 10 weiteren PCR-Zyklen bei der subtrahierten cDNA erschien. Obwohl nach der Nested PCR im Agarosegel keine deutlichen Unterschiede zwischen subtrahierter cDNA und der jeweiligen TK sichtbar waren, konnte somit eine gute Subtraktionseffizienz für beide Larvenpopulationen der Durchführung 1 festgestellt werden. Bei den Proben der **Durchführung 2** hingegen, die in der zweiten subtraktiven Hybridisierung gemäß dem Herstellerprotokoll behandelt wurden, war die Subtraktionseffizienz unzureichend. Es erschienen sowohl bei der subtrahierten cDNA als auch der TK der L3ni und L3i erst nach Ablauf von 38 PCR-Zyklen schwach erkennbare Amplifikationsprodukte, nach 43 Zyklen war jeweils eine deutliche Bande vorhanden.

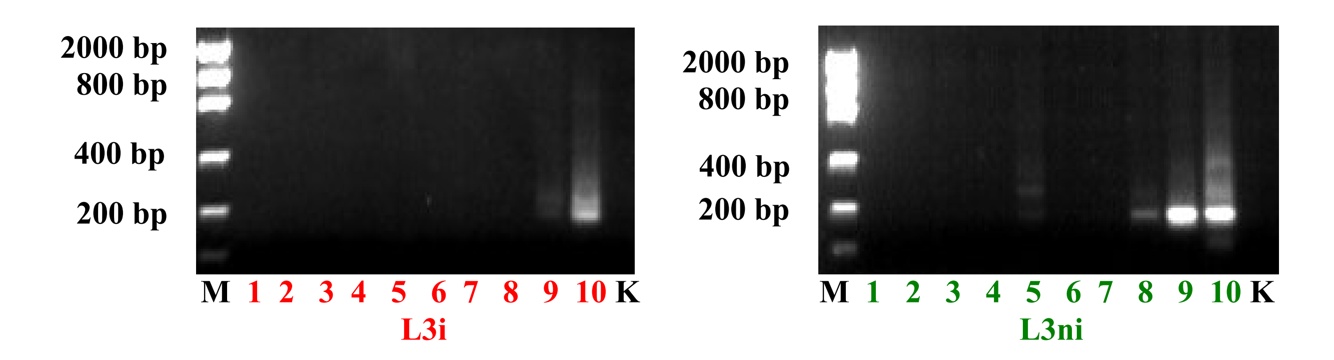


Abb. 21: Analyse der Subtraktionseffizienz der Durchführung 1

2 %iges Agarosegel

M: Low DNA MASS™ Ladder

1-5:	subtrahierte cDNA	1, 6:	18 PCR-Zyklen
6-10:	nicht subtrahierte TK	2, 7:	23 PCR-Zyklen
K:	Negativkontrolle	3, 8:	28 PCR-Zyklen
		4, 9:	33 PCR-Zyklen
		5, 10:	38 PCR-Zyklen

4.4 Subtrahierte cDNA-Banken

4.4.1 Nested PCR

Die Nested PCR zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken, in welcher die subtrahierte L3ni- und L3i-cDNA der Durchführung 1 als Template eingesetzt wurde, ergab nach der Ge-

lelektrophorese einen „Schmier“ im Bereich von ca. 200 bp bis gut 2000 bp. Die Kontroll-cDNAs C1 und C2R, die als spätere Negativkontrollen im Differential Screening dienten, wiesen die erwartete Fragmentlänge von ca. 340 bp (C1) bzw. 200 bp (C2R) auf.

4.4.2 Subtrahierte cDNA-Banken der L3ni und L3i

Mit Hilfe einer PCR erfolgte eine Insertkontrolle der Klone, die zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken ausgewählt worden waren. Dabei wurden 173 Klone der L3ni und 148 Klone der L3i überprüft und solche ohne Insert oder mit mehr als einer Bande (rote Pfeile in Abb. 22) verworfen. Somit wurden die subtrahierten cDNA-Banken der L3ni und L3i von den jeweiligen Glyzerolstocks und der mittels Miniprep gewonnen Plasmid-DNA der verbleibenden 104 Klone der L3ni sowie 105 Klone der L3i repräsentiert. Die Insertlängen der jeweiligen Klone variierten zwischen 250 bp und 2200 bp, wobei die Mehrzahl der Klone ein 600 bp bis 1200 bp langes Insert besaß. Die Bezeichnung der Klone geschah durch Nennung der jeweiligen Larvenpopulation (L3ni oder L3i) in Kombination mit der Nummer des Klons (1 bis 104 respektive 105).

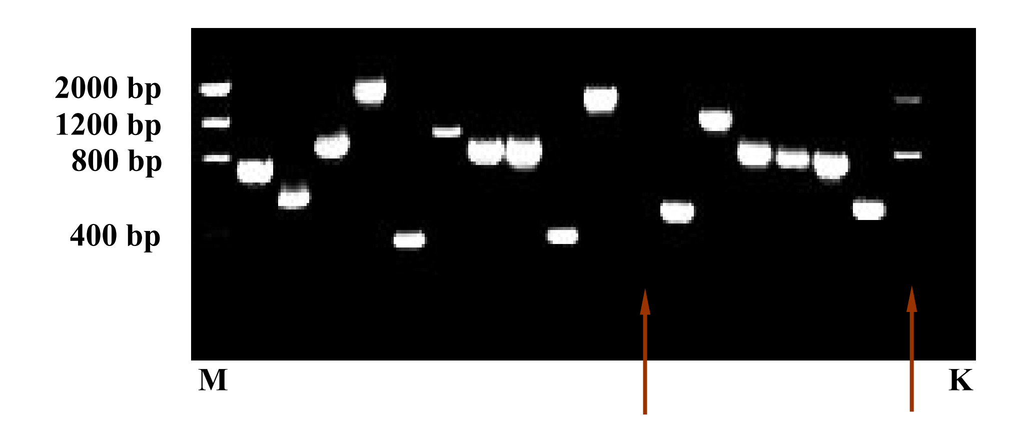


Abb. 22: Insertkontrolle einiger Klone der L3i

2 %iges Agarosegel

M: Low DNA MASS™ Ladder

K: Negativkontrolle

4.5 DIG-markierte cDNA-Sonden

4.5.1 Herstellung DIG-markierter cDNA-Sonden für das Differential Screening

Die mittels Nested PCR mit DIG-dUTP markierten Sonden der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA sowie der jeweiligen Tester-Kontrolle stellten sich im 2 %igen Agarosegel wie erwartet als ein „Schmier“ im Bereich von 200 bp bis 2000 bp dar.

Nach dem Multi-Enzymverdau der cDNA-Sonden mit den Restriktionsenzymen *Rsa*I, *Eae*I und *Sma*I wurden die Proben erneut gelelektrophoretisch analysiert. Dabei wiesen die mit Plasmid-DNA versetzten Kontrollen zur Überprüfung der Enzymaktivität jeweils die erwarteten 4 Banden der vorher berechneten Längen auf. Bei zusätzlich aufgetragener ungeschnittener Plasmid-DNA hingegen war auf gleicher Höhe keine Bande erkennbar, es fand somit ein vollständiger Enzymverdau statt. Im Vergleich zu den unverdauten Proben stellte sich der im 2 %igem Agarosegel sichtbare „Schmier“ der verdauten cDNA-Sonden in einem geringeren Größenbereich dar. Eine genaue Abschätzung der jeweiligen Größenbereiche war jedoch auf Grund der geringen aufgetragenen cDNA-Menge schwer möglich.

Die Konzentrationsbestimmung der Sonden, welche im Anschluss an die säulenchromatographische Aufreinigung durchgeführt wurde, ergab folgende Werte:

cDNA-Sonde	Konzentration	Reinheit
subtrahierte L3ni-cDNA	36,95 ng/µl	1,661
subtrahierte L3i-cDNA	37,00 ng/µl	1,568
L3ni-Tester-Kontrolle	35,55 ng/µl	1,634
L3i-Tester-Kontrolle	30,30 ng/µl	1,674

4.5.2 Überprüfung der DIG-cDNA-Sonden

Durch Verdünnungsreihen der synthetisierten Sonden wurde die DIG-markierte cDNA-Menge abgeschätzt. Ergibt dabei die Detektion ein sichtbares Signal bei einer aufgetragenen Menge von 0,1 pg cDNA-Sonde, liegt die erwartete Menge an markierter cDNA in der Sodenlösung vor. Nach der im Benutzerhandbuch (ROCHE, 2000) angegebenen 20 minütigen

Filmexposition war sowohl bei der Kontroll-DNA als auch den generierten cDNA-Sonden kein Signal zu detektieren. Nach einer Belichtungszeit von zwei Stunden wiesen alle Proben schwache Signale bei 0,1 pg aufgetragener DNA auf. Damit konnte die Konzentration an DIG-markierter cDNA in der Sondenlösung mit der in der photometrischen Messung ermittelten cDNA-Menge (s. 4.5.1) korreliert werden.

Die unten stehende Abbildung zeigt das Ergebnis der chemilumineszenten Detektion nach knapp 19 Stunden Filmexposition, wobei alle Proben als Duplikate auf die Membran aufgetragen wurden. Die Sonden der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA sowie die L3i-Tester-Kontrolle wiesen ein Signal bis 0,01 pg cDNA mit etwa gleicher Intensität auf. Dahingegen zeigte die Sonde der L3ni-Tester-Kontrolle nur bis zu einer Menge von 0,03 pg cDNA Signale. In den Hybridisierungsansätzen für das Differential Screening sollten die Sonden jedoch gleiche Sensitivität besitzen. Daher wurde entschieden, von der L3ni-Testerkontroll-Sonde die 2,5fache cDNA-Menge in der Hybridisierung einzusetzen.

Kontroll-DNA
subtrahierte L3i-Sonde
subtrahierte L3ni-Sonde
L3i-Tester-Kontroll-Sonde
L3ni-Tester-Kontroll-Sonde
1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 23: Analyse der Markierungseffizienz der cDNA-Sonden

Jeweils im Doppelansatz aufgetragene cDNA-Menge:

1:	10 pg	5:	0,1 pg
2:	3 pg	6:	0,03 pg
3:	1 pg	7:	0,01 pg
4:	0,3 pg	8:	Negativkontrolle

4.6 Differential Screening

Nach der Entwicklung der Chemilumineszenzfilme zeigten sich sowohl nach 1,5 stündiger als auch nach 40 minütiger Exposition deutliche Signalunterschiede beim Vergleich der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA-Banken in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten subtrahierten cDNA-Sonde. Besonders augenfällig war dabei der Unterschied in der Signalintensität beim Einsatz der subtrahierten L3i-cDNA-Sonde. Während fast alle Klone der L3i-cDNA-Bank sehr deutliche Signale entstehen ließen, war dies nur bei einigen Klonen der L3ni-cDNA-Bank der Fall. Insgesamt etwas weniger deutlich stellte sich dieser Intensitätsunterschied bei den cDNA-Banken unter der Verwendung der subtrahierten L3ni-cDNA-Sonde dar. Die Hybridisierung mit den Tester-Kontroll-Sonden der L3i und L3ni hingegen ergab beim Vergleich der beiden subtrahierten cDNA-Banken lediglich mit der L3i-Tester-Kontroll-Sonde einen Hinweis auf differentielle Transkription. Bei der Verwendung der Tester-Kontroll-Sonde der L3ni zeigten die cDNA-Banken der L3ni und L3i im Gesamtbild keinen Unterschied in der Signalstärke. Beim Vergleich der Detektion nach 40 minütiger bzw. 1,5 stündiger Belichtung ergaben sich lediglich Unterschiede in der Signalintensität, es konnten keine zusätzlichen Klone mit positivem Hybridisierungsergebnis beobachtet werden.

Zur Ermittlung differentiell transkribierter Genfragmente folgte ein Einzelvergleich der Klone basierend auf der Signaldetektion nach 40 minütiger Filmexposition. Hierbei wurden ausbleibende oder variierende Signalintensitäten eines Klons bezüglich der vier verschiedenen Hybridisierungssonden bewertet. Dabei stellten sich 44 von insgesamt 104 Klonen (42,3 %) der subtrahierten L3ni-cDNA-Bank und 58 von den 105 Klonen (55,2 %) der subtrahierten L3i-cDNA-Bank als differentiell transkribiert dar. Zwei solcher Klone sind in den Abb. 23 bis 26 beispielhaft mit Kreisen gekennzeichnet.

Die ebenfalls auf den einzelnen Membranen befindlichen Negativkontrollen, welche von den C1- und C2R-DNAs repräsentiert wurden, blieben auf allen Membranen negativ. Die Positionen der Negativkontrollen sind in den Abb. 23 bis 26, welche die Hybridisierungsergebnisse nach 40 minütiger Filmexposition darstellen, blau markiert.

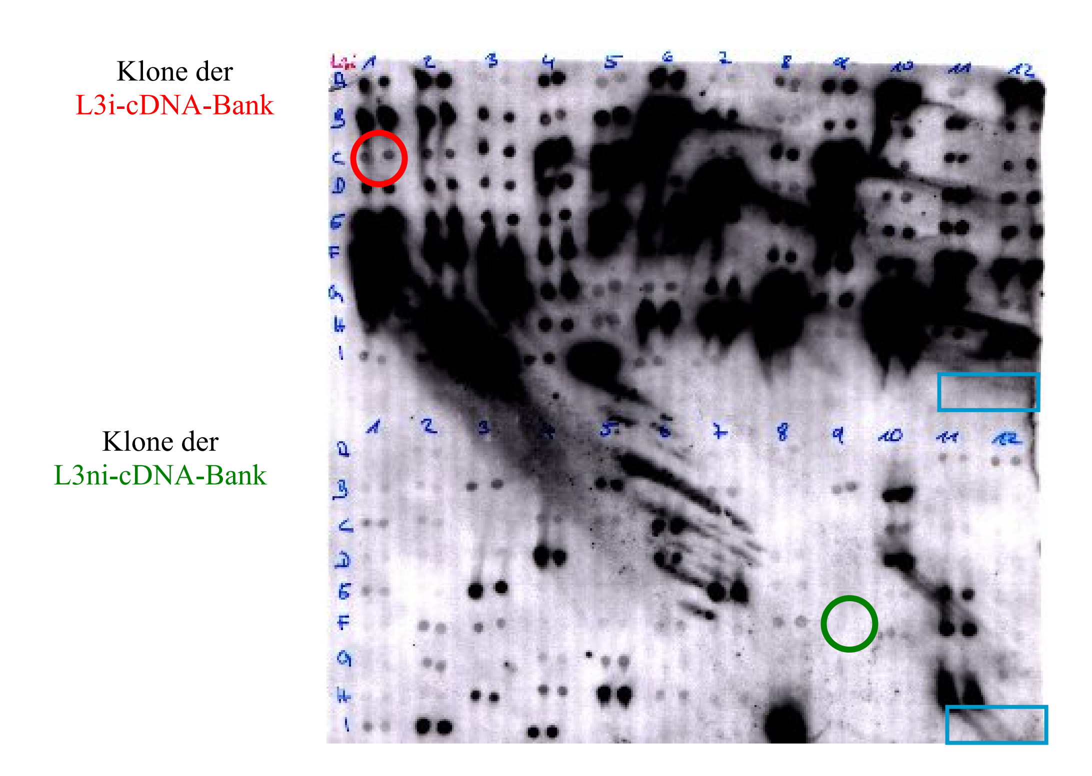


Abb. 24: Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der subtrahierten L3i-cDNA als Hybridisierungssonde

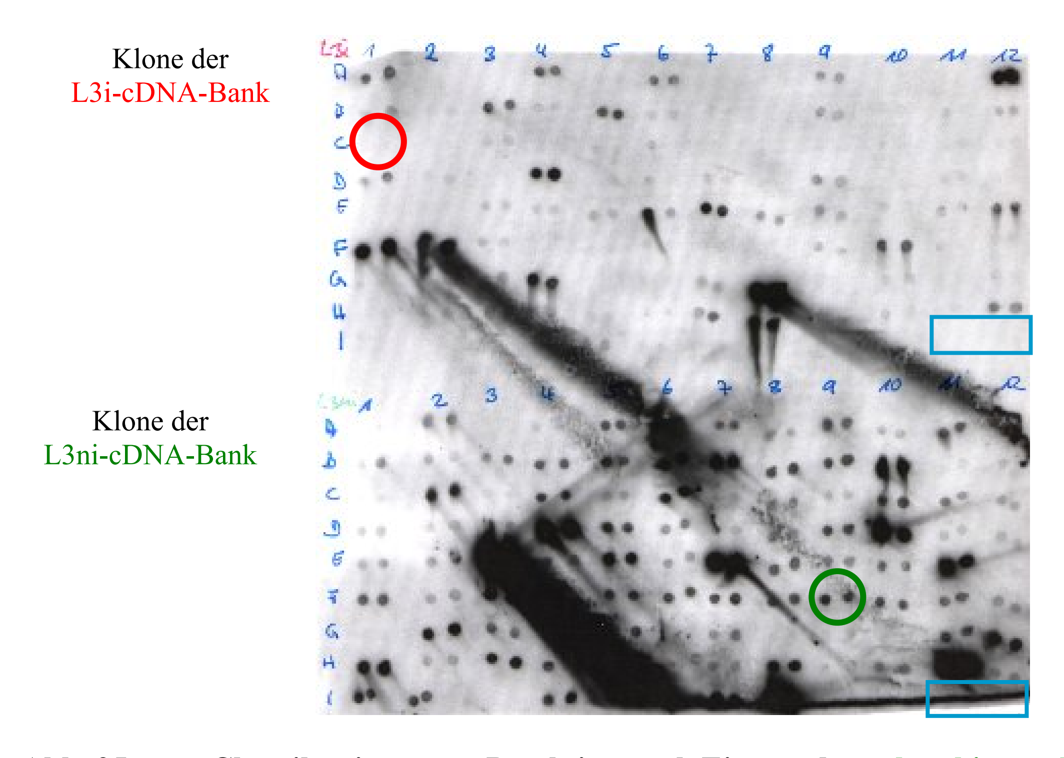


Abb. 25: Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der subtrahierten L3ni-cDNA als Hybridisierungssonde

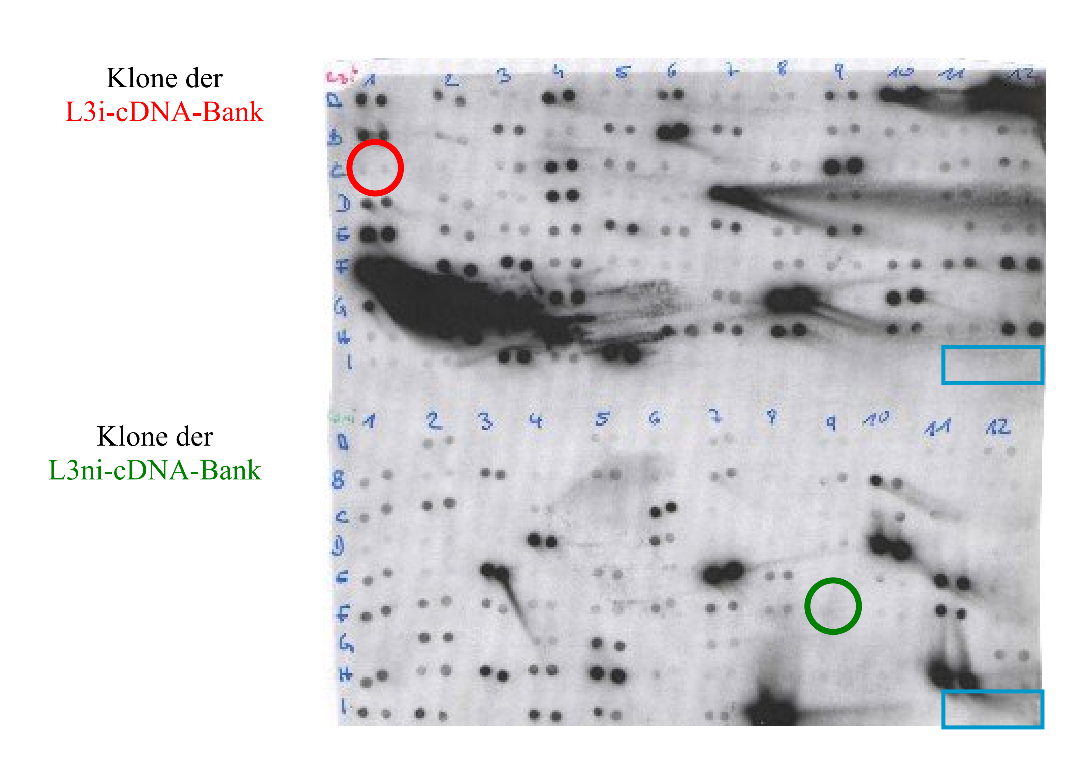


Abb. 26: **Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der L3i-Tester-Kontrolle als Hybridisierungsonde**

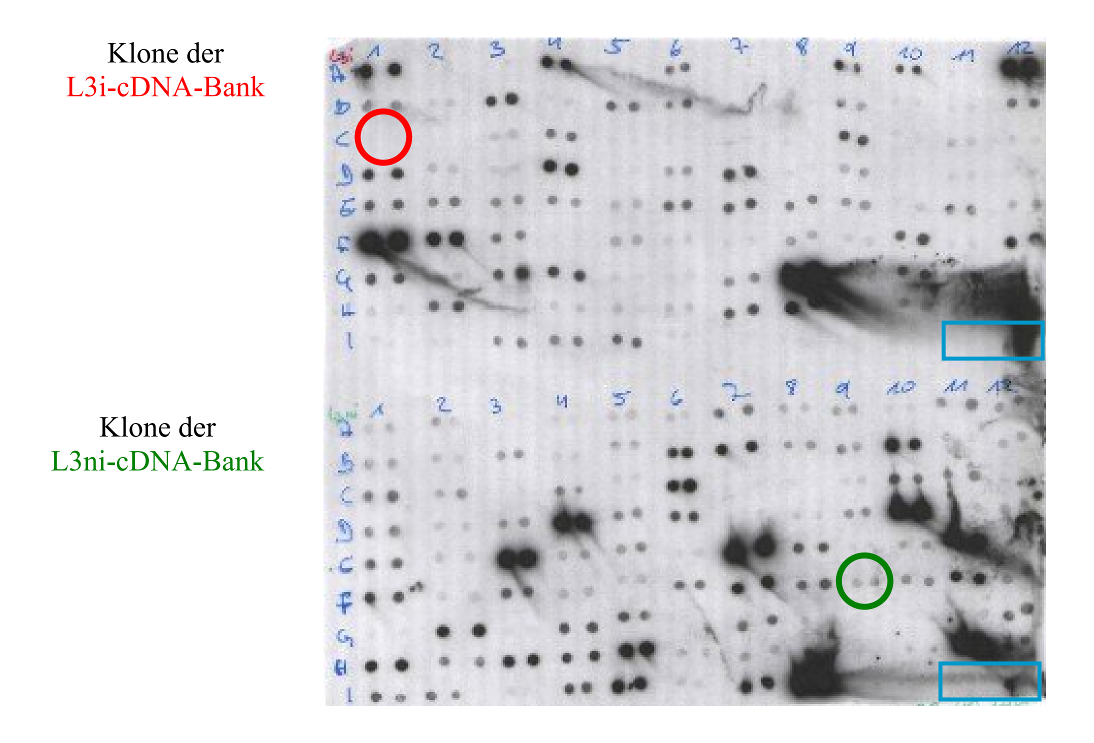


Abb. 27: **Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der L3ni-Tester-Kontrolle als Hybridisierungsonde**

4.7 Verifizierung differentiell transkribierter Sequenzen

4.7.1 Synthese DIG-markierter cDNA-Sonden der L3ni und L3i

Die Synthese der Sonden aus frisch isolierter mRNA der L3ni und L3i geschah im Rahmen der LD PCR, für welche 24 PCR-Zyklen als optimal ermittelt wurden. Nach der DIG-Markierung wurden die beiden cDNA-Sonden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen, wobei sich unter UV-Beleuchtung jeweils ein „Schmier" im Bereich von ca. 200 bp bis 4000 bp darstellte.

4.7.2 Restriktionsenzymspaltung der DIG-cDNA-Sonden

Im Anschluss an die Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I zeigte sich nach der Gelelektrophorese im 1,5 %igen Agarosegel bei den verdauten Proben im Gegensatz zu den unverdauten Proben eine Intensitätszunahme des „Schmier"s im Bereich von ca. 150 bp bis 500 bp. Des Weiteren konnten zwei Banden, die in der unverdauten L3ni-cDNA sichtbar waren, nicht mehr lokalisiert werden. Die zur Überprüfung der Enzymaktivität eingesetzten Kontrollansätze mit zugefügter Plasmid-DNA wiesen jeweils drei Banden der erwarteten Längen auf. Allerdings konnte in der Kontrolle des L3ni-Sondenansatzes noch eine schwache Bande des ungeschnittenen Plasmids in Höhe von ca. 4000 bp festgestellt werden, die Restriktionsenzymspaltung lief somit in diesem Ansatz unvollständig ab.

4.7.3 Konzentrationsbestimmung der L3ni- und L3i-Sonden

Nachdem die verdauten Sonden durch eine Säulenchromatographie aufgereinigt worden waren, fand eine photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration statt, welche folgende Werte ergab:

Sonde	Konzentration	Reinheit
cDNA-Sonde der L3ni:	27,10 ng/µl	1,694
cDNA-Sonde der L3i:	21,55 ng/µl	1,710

4.7.4 Überprüfung der DIG-markierten L3ni- und L3i-Sonde

Auf dem fixierten Film waren nach einer Expositionszeit von einer Stunde bei der aufgetragenen Sondenmenge von 0,3 pg sowohl bei der cDNA-Sonde der L3ni als auch der L3i deutliche Signale gleicher Intensität sichtbar, somit lag eine adäquate Menge an DIG-markierter cDNA in der Sondenlösung vor. Die Kontroll-DNA zeigte Signale bis zu einer Verdünnung von 0,1 pg DNA, welche in schwacher Ausprägung auch bei der L3ni- und L3i-Sonde zu beobachten waren. Nach einer auf vier Stunden verlängerten Filmbelichtung wiesen die synthetisierten Sonden ebenfalls eine deutliche Signalintensität bei 0,1 pg und damit die erwartete Menge an markierter cDNA auf. Die ermittelten cDNA-Konzentrationen von 27,10 ng/µl der L3ni respektive 21,55 ng/µl der L3i war daher der Menge an markierter Sonde gleichzusetzen.

4.7.5 Chemilumineszente Detektion

Die Hybridisierung der 104 bzw. 105 Klone der subtrahierten L3ni- und L3i-cDNA-Banken mit den cDNA-Sonden der beiden Larvenpopulationen erbrachte keinen deutlichen Hinweis auf eine differentielle Transkription. Die Inserts der Klone zeigten, wenn ein Signal erkennbar war, in den meisten Fällen sowohl mit der entsprechenden Tester- als auch der Driver-cDNA-Sonde ein positives Hybridisierungsergebnis, lediglich die Signalintensität variierte. Auffällig war, dass, unabhängig von der eingesetzten Sonde, nach 1,5 stündiger Filmexposition nur bei wenigen Klonen der subtrahierten L3i-cDNA-Bank gut sichtbare Signale detektiert werden konnten. Im Zuge einer Belichtung der Chemilumineszenzfilme für eine Dauer von 3,5 Stunden erhöhte sich in beiden subtrahierten cDNA-Banken die Anzahl an Klonen mit positivem Hybridisierungsergebnis. Zudem verstärkte sich die Signalintensität der Klone, die nach einer Expositionszeit von 1,5 Stunden nur schwach erkennbare Signale entstehen ließen. Dies galt sowohl bei der Verwendung der L3ni-cDNA-Sonde als auch beim Einsatz der L3i-cDNA-Sonde. Allerdings zeigten bei der verlängerten Belichtungsdauer auch die auf den jeweiligen Membranen befindlichen Negativkontrollen für die in der LD PCR inkorporierten Oligonukleotide im Gegensatz zur 1,5 stündigen Filmbelichtung nun ein schwach positives Signal, so dass diese Hybridisierungsergebnisse nicht zur Verifizierung der potentiell differentiell transkribierten cDNA-Fragmente herangezogen werden konnten. Abb. 28 und Abb. 29 zeigen

die Hybridisierungsergebnisse nach 1,5 stündiger Filmbelichtung. Die Positionen der Negativkontrollen sind in blau umrandet. Nach einer Neubewertung der nach dem Differential Screening als differentiell transkribiert angesehenen Klone unter Einbeziehung dieser Hybridisierungsergebnisse (1,5 stündige Filmexposition) verblieben von den 44 Klonen der subtrahierten L3ni-cDNA-Bank 22 Klone (50,0 %) und von den 58 Klonen der subtrahierten L3i-cDNA-Bank 26 Klone (44,8 %) als differentiell transkribiert. Insgesamt ergaben sich somit 24,8 % der 105 Klone der subtrahierten L3i-cDNA-Bank und 21,2 % der 104 Klone der subtrahierten L3ni-cDNA-Bank als verifiziert differentielle Gentranskripte.

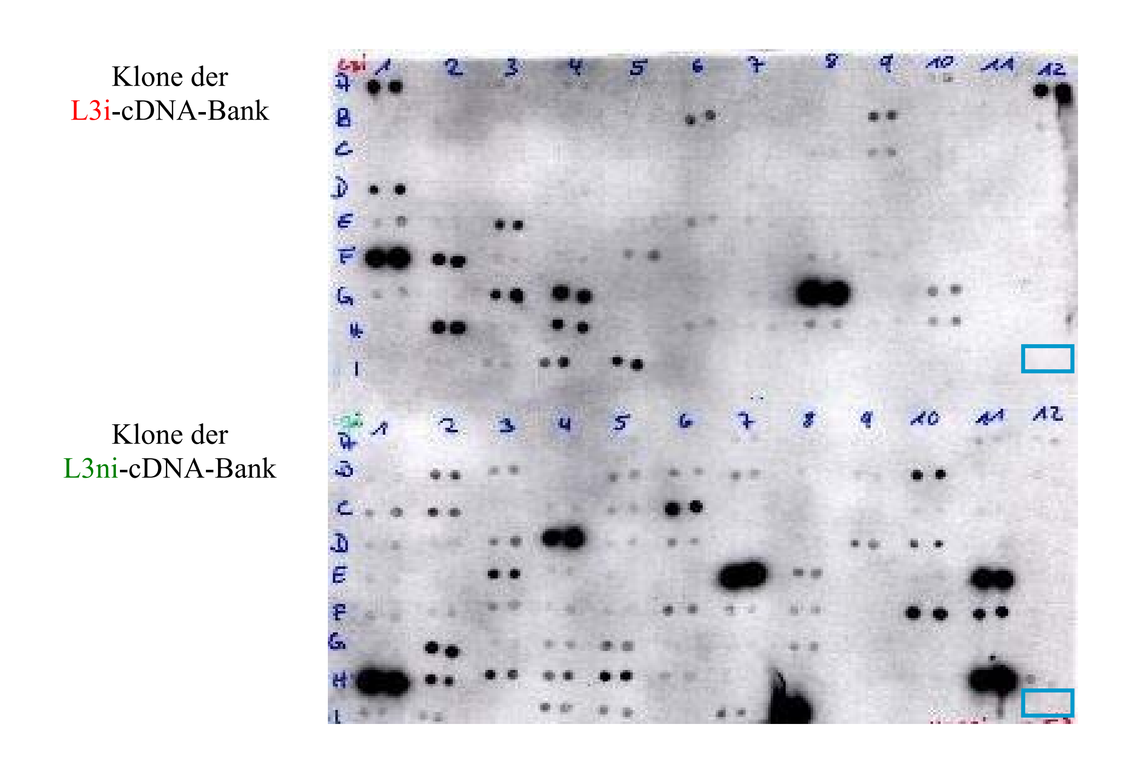


Abb. 28: Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der L3i-cDNA-Sonde

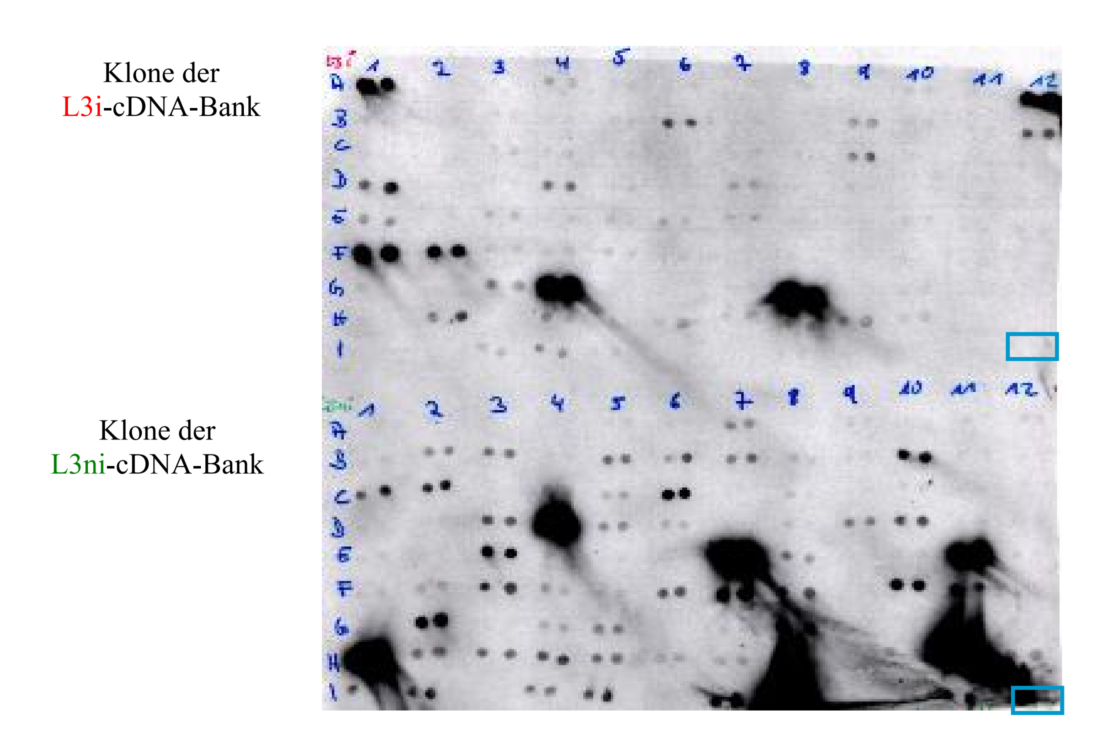


Abb. 29: Chemilumineszente Detektion nach Einsatz der L3ni-cDNA-Sonde

4.8 Differentiell transkribierte Gene bei *Dictyocaulus viviparus*

Folgende Klone der subtrahierten cDNA-Banken konnten nach dem Differential Screening und der sich anschließenden Verifizierung als differentiell transkribiert angesehen werden:

L3i- Klon	Position auf der Membran	**L3i-** Klon	Position auf der Membran	**L3ni-** Klon	Position auf der Membran	**L3ni-** Klon	Position auf der Membran
2	A2	64	F4	7	A7	63	F3
8	A8	68	F8	16	B4	67	F7
10	A10	69	F9	18	B6	69	F9
14	B2	71	F11	19	B7	75	G3
18	B6	75	G3	20	B8	80	G8
19	B7	82	G10	22	B10	83	G11
25	C1	86	H2	28	C4	91	H7
26	C2	88	H4	32	C8	92	H8
29	C5	90	H6	41	D5	103	I7
33	C9	94	H10	51	E3		
46	D10	99	I3	54	E6		
51	E3	100	I4	56	E8		
53	E5	101	I5	57	E9		

Tab. 2: Klone mit differentiell transkribierten Inserts

4.8.1 Darstellung der Inserts

Alle Klone mit differentiell transkribierten Insert-Sequenzen wurden nach einer Midiprep einem *Eco*RI-Verdau unterzogen. Neben der verdauten Plasmid-DNA wurden als Kontrolle jeweils auch die entsprechenden, auf die Nylonmembranen aufgebrachten cDNA-Proben mittels 2 %iger Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. Befanden sich infolge einer vorhandenen Erkennungssequenz von *Eco*RI in der Insertsequenz zwei Banden im Agarosegel, entsprach die Summe der Fragmentlängen der Bandenlänge der jeweiligen cDNA-Probe. War im Insert keine *Eco*RI-Schnittstelle vorhanden, lagen die Banden der Inserts und der zugehörigen cDNA-Probe stets auf gleicher Höhe. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Klone tatsächlich die differentiell transkribierten cDNA-Sequenzen enthielten.

4.8.2 Sequenzierung der Inserts und Sequenzbearbeitung

Die Sequenzierung der insgesamt 48 differentiell transkribierten cDNA-Fragmente (22 der L3ni und 26 der L3i) erfolgte zur Absicherung der korrekten Basenabfolge in beide Richtungen. Wiesen die Vorwärts- und Rückwärtssequenz nicht mindestens eine Übereinstimmung von 98 % auf, was insbesondere bei sehr langen bzw. Inserts mit Poly-A-Sequenzen der Fall war, erfolgte eine erneute Sequenzierung.

Innerhalb einer Larvenpopulation erfolgte auch ein Vergleich der Sequenzen untereinander. Dabei stellte sich heraus, dass der Klon **L3ni 69** und **L3ni 92** ein zu 100 % identisches Insert besaßen. Die Klone **L3i 18** und **L3i 86**, deren Vorwärts- und Rückwärtssequenz jeweils zu 99 % respektive 100 % identisch waren, wiesen untereinander eine 98 %ige Übereinstimmung auf. Bei Klon L3i 18 betrug die Länge des Inserts 686 bp, von Klon L3i 86 hingegen 683 bp. Mit dem 548 Nukleotide umfassenden Insert von Klon **L3i 99** zeigten diese eine Ähnlichkeit von 66 % bzw. 67 %. Dabei waren mit Ausnahme zweier Basen die jeweils letzten 348 bp der drei verschiedenen Inserts identisch. Das Insert von Klon **L3i 82**, welches aus 910 Nukleotiden bestand, zeigte mit der 995 bp langen Insertsequenz des Klons **L3i 101** eine Identität von 71 %, wobei der homologe Bereich bei Base 195 des Klons L3i 101 respektive Base 1 des Klons L3i 82 begann. Der Sequenzidentitätsbereich, der mit der jeweils letzten

Base der beiden Klone endete, wurde auf einer Länge von 111 Nukleotiden in Form einer Sequenzlücke unterbrochen, da diese Nukleotide bei Klon L3i 101 nicht vorhanden waren.

4.8.3 Sequenzidentitätsvergleiche

Mit den erhaltenen Sequenzen der differentiell transkribierten Inserts der subtrahierten cDNA-Banken wurde ein Vergleich auf Nukleinsäureebene (BLASTN) mit in GenBank (NCBI) publizierten Sequenzen durchgeführt. Des Weiteren wurden mittels Align™Plus die drei möglichen Aminosäuresequenzen übersetzt und auf dieser Ebene (BLAST „*search for short, nearly exact matches*“) mit publizierten Sequenzen anderer Organismen verglichen. Mit cDNA-Fragmenten, welche in den vorangegangenen Sequenzidentitätsvergleichen noch keine signifikanten Identitäten aufwiesen, erfolgte ein erneuter Vergleich mittels TBLASTX. Falls hierbei Signifikanzen festgestellt werden konnten, wurden die Sequenzen nachfolgend bearbeitet und die so erhaltenen Aminosäuresequenzen nochmals mit dem BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ auf Aminosäureebene verglichen. Im folgenden sind die ermittelten signifikanten Homologien beschrieben, an welche die Anforderung gestellt wurde, ein E-Value von kleiner als 0,001 in Verbindung mit einer mindestens 40 %igen Übereinstimmung aufzuweisen, wobei die Prozentzahl in Klammern die Sequenzähnlichkeit angibt. Diese ist bestimmt durch den Anteil identischer und iso-funktioneller Aminosäuren. Die Auflistung erfolgt in numerischer Reihenfolge der Klone getrennt nach L3ni bzw. L3i, wobei bestehende Sequenzidentitäten auf Nukleinsäureebene zuerst genannt werden. Die jeweiligen Accession- bzw. Versionen-Nummern der teilidentischen Sequenzen sind in Klammern angeführt.

Der Klon **L3ni 16** enthielt ein 723 bp umfassendes Insert, welches mit zwei Gensequenzen für Paramyosin (*unc*-15) sowie einem Cosmid von *C. elegans* (NM_059648.1; CEUNC15 sowie CEF07A5) eine 80 %ige Übereinstimmung über 528 bp aufwies. Die Identität mit dem Cosmid bezog sich dabei auf den Folgestrang. Mit der mRNA für Paramyosin von *B. malayi* (BMILM5) bestand auf einer Länge von 331 Nukleotiden eine Identität von ebenfalls 80 %. Weitere Teilidentitäten mit Paramyosinsequenzen anderer Organismen wie *Wucheria bancrofti* oder *Dirofilaria immitis* werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt. Auf Aminosäureebene zeigten sich die 240 translatierten Aminosäuren über die gesamte Länge zu 95 % i-

dentisch (97 %) mit drei Paramyosinsequenzen von *C. elegans* (S04027; CAA30857.1, NP_492085.1) und einem hypothetischen Protein von *C. briggsae* (CAE66601.1). Weitere Paramyosin-Identitäten, beispielsweise mit *O. volvolus*, *W. bancrofti* oder *Anisakis simplex*, werden hier nicht weiter beschrieben.

Das 657 bp lange Insert des Klons **L3ni 22** wurde in 138 Aminosäuren übersetzt. Es ergab sich auf einer Länge von 72 Aminosäuren eine Teilidentität von 68 % (86 %) mit einem putativen Protein von *C. elegans* (NP_492899.1).

Der Klon **L3ni 51** besaß ein 684 Nukleotide umfassendes Insert. Dieses war auf einer Länge von 53 bp zu 88 % identisch mit der mRNA für einen Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins sowie einem Cosmid von *C. elegans* (NM_070441.1 bzw. CEY73F8A). Mit denselben Sequenzen bestand des Weiteren eine 85 %ige Übereinstimmung über 49 bp hinweg. Die genannten Identitäten bezogen sich bei dem Cosmid auf den Folgestrang. Auf Aminosäureebene zeigte dieser Klon über eine 212 Aminosäuren umfassende Teilsequenz der insgesamt 227 Aminosäuren eine 64 %ige Identität (75 %) mit dem Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins von *C. elegans* (NP_502842.1).

Mit dem *multidrug*-Resistenzprotein (mrp-3) von *C. elegans* (NP_510616.1) wies die in 199 Aminosäuren translatierte Insertsequenz des Klons **L3ni 54**, welche aus 599 bp bestand, eine Teilidentität von 59 % (78 %) über 188 Aminosäuren auf. Mit der Sequenz mrp-4 desselben Organismus (NP_509658.1) waren von 208 Aminosäuren 46 % identisch (63 %). Weitere signifikante Übereinstimmungen mit *multidrug*-Resistenzproteinen auch anderer Organismen sowie ABC-Transportern oder ATP-bindenden Kassetten werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Der Klon **L3ni 56** beinhaltete ein aus 602 Nukleotiden bestehendes Insert, welches in 107 Aminosäuren übersetzt wurde. Dabei konnte über einen Bereich von 87 Aminosäuren eine 56 %ige Übereinstimmung (66 %) mit dem vermeintlichen Protein bilateralen Ursprungs von *C. elegans* (NP_491869.1) festgestellt werden. Mit „agCP10600“ von *Anopheles gambiae* strain PEST (EAA05528.1) bestand eine Teilidentität von 44 % (65 %) über 72 Aminosäuren. Weitere signifikante Identitäten wurden mit zwei G-Protein gekoppelten Rezeptoren von *Drosophila melanogaster* (NP_569948.3 und NP_788854.1) über eine Sequenzlänge von 63 A-

minosäuren beobachtet, von denen sich 41 % (69 %) identisch zeigten. Mit zwei hypothetischen Proteinen von *Homo sapiens* sowie einem unbenannten Protein von *Mus musculus* (NP_ 060108.1, AAH02694 sowie BAB28536.1) konnte über 64 Aminosäuren hinweg eine Teilidentität von 42 % (64 %) beobachtet werden.

Eine 80 %ige Übereinstimmung über 122 der 414 Nukleotide des Inserts von Klon **L3ni 67** herrschte mit dem essentiellen Gen *anc*-1 von *C. elegans* (NM_058952.1), welches für insgesamt drei verschiedene Protein-Isoformen codiert. Mit zwei dieser Isoformen, nämlich einem Mitglied der nukleären *anchorage* Proteinfamilie 1 sowie dem nukleären *anchorage* Protein 1 (NP_491353.1 sowie ANC1_CAEEL), zeigte die in 93 Aminosäuren übersetzte Insertsequenz eine 73 %ige Teilidentität (82 %), wobei sich diese über 89 Aminosäuren erstreckte. Weiterhin bestand mit Nesprin-1 beta 2 von *H. sapiens* (AA027774.1) eine 64 %ige Übereinstimmung (79 %) in Bezug auf 39 Aminosäuren. Mit 29 weiteren Aminosäuren konnte eine 44 %ige Teilidentität (62 %) beobachtet werden. Gleiche Identitäts- und Ähnlichkeitsverhältnisse zeigten sich mit der Nesprin 1 Isoform beta von *H. sapiens* (z.B. NP_056108.1). Weitere signifikante Identitäten werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Der Klon **L3ni 69**, welcher ein mit dem Klon **L3ni 92** identisches Insert von 417 Basenpaaren enthielt, zeigte auf einer Länge von 37 respektive 41 Nukleotiden eine 94 %ige bzw. 90 %ige Übereinstimmung mit der mRNA-Sequenz für die Superoxiddismutase von *H. contortus* (Z69630.1). Auf Aminosäureebene waren 104 der übersetzen 105 Aminosäuren zu 75 % (85%) identisch mit der extrazellulären Superoxiddismutase von *H. contortus* (CAA93449.1). Die gesamte translatierte Aminosäuresequenz stimmte zudem zu 65 % (83 %) mit einer Superoxiddismutase von *C. elegans* (NP_4999091.1) überein. Weitere Identitäten mit Superoxiddismutasen von *C. elegans* und anderen Organismen wie *D. melanogaster* werden hier nicht weiter angeführt.

Das Insert des Klons **L3i 10** bestand aus 827 Nukleotiden, welche in 273 Aminosäuren übersetzt werden konnten. Diese ergaben eine 40 %ige Übereinstimmung (51 %) auf einer Länge von 259 Aminosäuren mit einem putativen Protein von *C. elegans* (NP_506141.1).

Mit der mRNA-Sequenz eines putativen Proteins sowie einem Cosmid von *C. elegans* (NP_075530.1 sowie CEF53H2) wies das 756 bp lange Insert des Klons **L3i 33** Identitäten

auf. Hierbei zeigten sich von 56 bzw. 75 Nukleotiden 91 % respektive 85 % identisch, wobei sich diese Übereinstimmungen im Falle des Cosmids auf den Folgestrang bezogen. Die in 251 Aminosäuren übersetzte Insertsequenz stimmte mit dem oben genannten putativen Protein (NP_507931.1) über eine Teilsequenz von 148 Aminosäuren zu 48 % überein (56 %). Des Weiteren bestand noch über 7 Aminosäuren hinweg eine 85 %ige Identität (100 %).

Der Klon **L3i 82** beinhaltete ein 910 bp langes Insert, welches 133 Aminosäuren ergab. Davon zeigten 95 Aminosäuren eine 73 %ige Teilidentität (81 %) zu einer Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT) von *C. elegans* (NP_505563.1). Mit einem weiteren Homolog sowie einem Mitglied der Familie der PNMTs von *C. elegans* (S27784 sowie NP_498914.1) waren von 86 Aminosäuren 51 % identisch (68 %).

Das 496 Nukleotide umfassende Insert von Klon **L3i 88** konnte in 106 Aminosäuren übersetzt werden. Über einen 74 Aminosäuren umfassenden Teilbereich bestand eine Identität von 55 % (66 %) mit einer Guanylyl-Cyclase (*gcy*-34) von *C. elegans* (NP_506319.1). Mit der *gcy*-32 und einer löslichen Guanylat-Cyclase desselben Organismus (NP_506452.1 und CAC35530.1) herrschten über denselben Teilbereich Identitäten von 52 % (64%). Weitere Übereinstimmungen mit Guanylyl- bzw. Guanylat-Cyclasen auch anderer Organismen werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Der Klon **L3i 99** besaß ein aus 548 bp bestehendes Insert, welches in 182 Aminosäuren translatiert wurde. Diese zeigten auf einer Länge von 217 Aminosäuren Identitäten von 41 % (49 %) mit zwei durch alternatives Spleißen entstehenden DM DNA-Bindungsdomänen enthaltenden Proteinen von *C. elegans* (NP_502770.1; NP_502771.1).

Die 398 bp lange und in 105 Aminosäuren translatierte Insertsequenz des Klons **L3ni 17** zeigte über 44 Nukleotide hinweg eine 93 %ige Teilidentität mit zwei essentiellen Troponin T-Sequenzen (*tnt*-4) sowie einem Cosmid von *C. elegans* (NM_071143.2; NM_ 182357.1 sowie AF039039.2). Des Weiteren bestand auf Aminosäureebene über 102 Aminosäuren hinweg eine 75 %ige Übereinstimmung (89 %) mit Troponin T (tnt-3) und einem hypothetischen Protein von *C. elegans* (NP_509338.1 sowie T15496). Eine 88 %ige bzw. 81 %ige Übereinstimmung über einen 44 bp respektive 81 bp umfassenden Bereich ergab sich mit drei weiteren *tnt*-3-Sequenzen von *C. elegans* (NM_171736.1; NM_076937.1; NM_07636.1) bereits auf

Nukleinsäureebene, das E-Value betrug jedoch nur 0,012. Mit Troponin von *O. ostertagi* (CAD11862.1) waren auf einer Länge von 100 Aminosäuren 72 % identisch (86%). Weitere signifikante Homologien mit verschiedenen Troponin-Sequenzen anderer Organismen, wie Troponin T von *Libellula pulcella* und *Periplaneta americana* werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt. Dieser Klon wies beim Southern dot blotting Unterschiede in der Signalintensität bezüglich der beiden Larvenpopulationen auf. Da jedoch beim Differential Screening nur geringfügige Differenzen festgestellt werden konnten, wurde dieser Klon nicht weiter verfolgt.

4.8.3.1 Mittels TBLASTX festgestellte Homologien

Bei den im Folgenden beschriebenen Inserts konnten erst mit Hilfe des TBLASTX signifikanten Homologien festgestellt werden, da sich vor Beginn der homologen Aminosäuresequenz ein Stopcodon befand. Daraufhin erfolgte eine weitere Sequenzbearbeitung mit dem Align™ Plus-Programm. Die hinter dem jeweiligen Stopcodon befindliche Aminosäuresequenz wurde nachfolgend mittels dem BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ sowohl in ihrer Gesamtheit als auch ab dem ersten Methionin, dem potentiellen Startcodon, mit den publizierten GenBank-Sequenzen verglichen. Die hierbei beobachteten signifikanten Übereinstimmungen sind nachfolgend in numerischer Reihenfolge der Klone beschrieben.

Der Klon **L3i 53** besaß ein 621 bp langes Insert, welches in 111 Aminosäuren translatiert werden konnte. Dieses zeigte sich über 62 Aminosäuren zu 58 % identisch (77 %) mit einer Glycerol-Kinase von *C. elegans* (NP_494721.1). Mit einer solchen von *D. melanogaster* (NP_524655.1) bestand über einen Bereich von 72 Aminosäuren eine 40 %ige Übereinstimmung (50 %). Weitere signifikante Identitäten mit Glycerin-Kinasen anderer Organismen wie *H. sapiens* oder *Streptomyces avermitilis* werden an dieser Stelle nicht weiter beschrieben. Erfolgte der Sequenzidentitätsvergleich ab dem ersten Methionin mit nur 72 Aminosäuren, umfasste der Teilidentitätsbereich mit der oben genannten Glycerin-Kinase von *C. elegans* nur noch 40 Aminosäuren, von denen 55 % (80 %) identisch waren. Die Identitäten mit den anderen oben genannten Proteinen genügten nicht mehr den an eine Signifikanz gestellten Anforderungen.

Das 475 bp lange Insert des Klons **L3i 75** wurde in 156 Aminosäuren übersetzt. Mit einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase A_2 von *C. elegans* (NP_500969.1) herrschte eine Teilidentität von 67 % (77 %) über 120 Aminosäuren. Über 129 Aminosäuren erstreckte sich die 48 %ige Übereinstimmung (61 %) mit ENSANGP00000022338 von *A. gambiae* (XP_319089.1). Mit einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase A_2 von *H. sapiens* (BAA94997.1) bestand eine Teilidentität von 44 % (56 %) über einen Bereich von 146 Aminosäuren. Die beschriebenen Ergebnisse wurden dabei nicht beeinflusst, wenn der Sequenzidentitätsvergleich erst ab dem ersten Methionin (129 Aminosäuren) erfolgte. Weitere signifikante Homologien werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Der Klon **L3i 100** beinhaltete ein 698 Nukleotide umfassendes Insert, translatiert ergaben sich 180 Aminosäuren, auf die ein Stopcodon folgte. Somit lag bereits die gesamte Sequenz des Proteins vor. Sowohl mit der gesamten Aminosäuresequenz als auch ab dem ersten Methionin (169 Aminosäuren) konnte eine über 181 Aminosäuren bestehende 61 %ige (69%) Identität mit einem Mitglied der Calmodulin-Familie von *C. elegans* (NP_506147.1) festgestellt werden. Mit einem hypothetischen Protein von *C. elegans* (T20411) bestand eine Teilidentität von 81 % (95 %) über einen Bereich von 61 Aminosäuren bzw. eine 53 %ige Teilidentität (58 %) über 112 Aminosäuren. Weitere Identitäten mit Calmodulinen verschiedenster Organismen (z.B. *C. elegans*, *Vitis vinifera*, *Solanum commersonii*) wiesen zwar ein entsprechendes E-Value, aber einen zu geringen Prozentsatz identischer Aminosäuren auf, um als signifikant zu gelten.

Das 995 bp umfassenden Insert des Klons **L3i 101**, welches sich mit dem des Klons L3i 82 zu 71 % identisch zeigte, konnte in 302 Aminosäuren übersetzt werden. Unabhängig davon, ob der Sequenzidentitätsvergleich ab der ersten Aminosäure oder dem ersten Methionin (244 Aminosäuren) durchgeführt wurde, ergaben sich Identitäten mit den bereits bei Klon L3i 82 beschriebenen Proteinen. Die Identität mit der PNMT erstreckte sich dabei über 244 Aminosäuren und betrug 61 % (72 %) vor. Zu dem Homolog als auch dem Mitglied der PNMT-Familie bestand eine Übereinstimmung von 52 % (67 %) über eine Länge von 92 Aminosäuren sowie eine 38 %ige Identität (55 %) bezüglich 72 Aminosäuren.

Die mit dem Klon L3i 99 teilweise und untereinander zu 98 % identischen Klone **L3i 18** und **L3i 86** mit einer Insertlänge von 686 bp bzw. 683 bp zeigten im Gegensatz zum Insert des Klons L3i 99 erst im TBLASTX Identitäten. Diese genügten dabei nicht den an eine Signifikanz gesetzten Anforderungen, werden jedoch im Folgenden kurz beschrieben: Es konnte jeweils eine 115 Aminosäuren lange Sequenz erstellt werden, die mit dem unter L3i 99 genannten Proteinen von *C. elegans* eine Übereinstimmung von 31 % (41%) über insgesamt 138 Aminosäuren ergab.

4.9 Charakterisierung der differentiell transkribierten Gene

4.9.1 Spezifität der RACE-Primer

Die mit den genspezifischen Primerpaaren für die Inserts der Klone L3ni 56, L3i 82 sowie L3i 88 generierten Touchdown PCR-Produkte ließen im Agarosegel unabhängig von der gewählten Primerkombination neben der Bande mit der erwarteten Länge noch zwei weitere Banden entstehen. Eine weitere Bande trat mit den GSPs für das Insert von Klon L3i 33, L3i 75 sowie L3i 100 auf.

Mit den beiden Primerpaaren für den Klon L3ni 54 konnte auch nach wiederholten Versuchen kein Produkt amplifiziert werden. Bei der Verwendung der GSP für die übrigen differentiell transkribierten cDNA-Sequenzen war im Zuge der gelelektrophoretischen Kontrolle jeweils eine Bande der erwarteten Fragmentlänge festzustellen.

4.9.2 Sequenzierung der GSP-Amplifikationsprodukte

Die GSP-Amplifikationsprodukte, welche mehr als eine Bande nach der Gelelektrophorese aufwiesen, unterlagen einer Klonierung und Sequenzierung. Für das Primerpaar L3i 33 ergaben sich dabei eine 599 bp sowie eine 444 bp lange Sequenz, wobei die Differenz von 155 bp durch eine Lücke in den sonst identischen Sequenzen repräsentiert wurde. Die kürzere der beiden Sequenzen stimmte mit dem entsprechenden Teilbereich des Klons L3i 33 überein. Ähnliche Verhältnisse konnten mit dem Primerpaar für den Klon L3i 75 festgestellt werden.

Die erhaltenen 187 bzw. 255 Nukleotide umfassenden Amplifikationsprodukte waren mit Ausnahme eines 67 bp langen Gaps identisch, wobei auch hier die kürzere Sequenz mit dem Insert des Klons korrespondierte. Ebenso verhielt es sich mit den beiden Sequenzen, welche mit der genspezifischen Primerkombination für den Klon L3i 100 generiert wurden. Wiederum stimmte das kürzere, 203 bp lange PCR-Produkt mit dem Insert des Klons überein. Bei der längeren, aus 325 Basenpaaren bestehenden Sequenz, wurde eine 123 Nukleotide umfassende Sequenzlücke der sonst homologen Sequenzen beobachtet. Die PCR-Produkte der Primerkombination für den Klon L3i 88 besaßen eine Länge von 182 bp, welche mit dem Klon L3i 88 identisch waren, sowie 255 bp und 311 bp, die wiederum eine 55 Nukleotide bzw. 114 Nukleotide umfassende Sequenzlücke bedingten. Zwei solcher Lücken über eine Länge von 69 bp respektive 49 bp wurden bei der Verwendung der GSPs für den Klon L3ni 56 beobachtet, wobei die sequenzierten Banden eine Länge von 262 bp, 311 bp sowie 383 bp besaßen. Ein Alignment-Ausschnitt dieser drei Sequenzen, von welchen die kürzeste zu dem entsprechenden Insertbereich des Klons L3ni 56 homolog war, ist in Abb. 30 dargestellt. Die Amplifikationsprodukte der GSPs für den Klon L3i 82 erwiesen sich als 363 bp, 468 bp und 538 bp umfassende Sequenzen, deren Längendifferenzen ebenfalls zwei Sequenzlücken mit einer Länge von 72 bp respektive 104 bp bedingten. Keine dieser drei Sequenzen stimmte dabei mit dem zugehörigen Teilbereich der Klone L3i 82 bzw. L3i 101 zu 100 % überein, es traten wiederum Sequenzlücken auf.

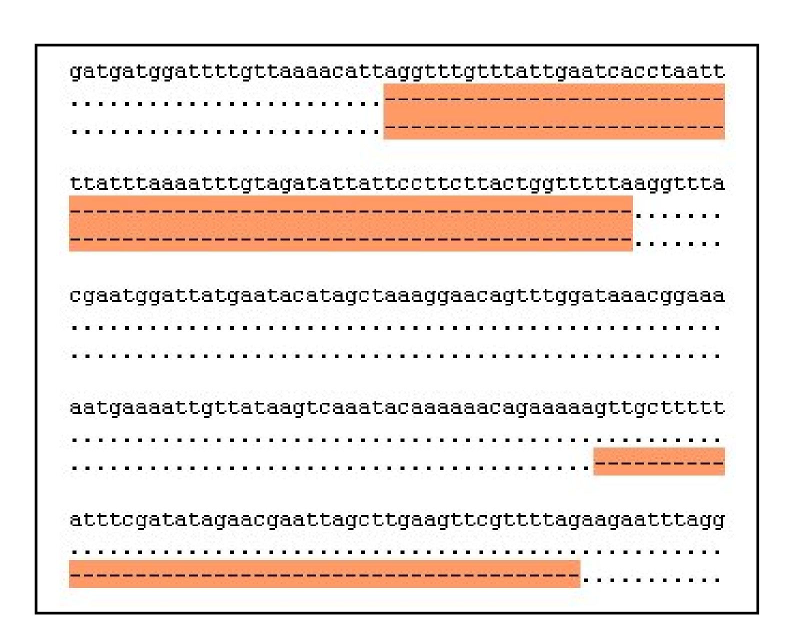


Abb. 30: Alignment-Ausschnitt der drei L3ni 56-GSP-Banden

4.9.3 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) und s*pliced leader* 1 (SL1-) PCR

Die differentiell transkribierten Genfragmente der L3ni und L3i sollten durch den Einsatz genspezifischer Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer vervollständigt werden.

Bei der Durchführung der RACE gestaltete sich insbesondere die 5´-RACE als schwierig, da mit der zunächst generierten Erststrang-cDNA bei den Sequenzen L3ni 67, L3i 10, L3i 82 sowie L3i 88 kein Amplifikationsprodukt generiert werden konnte. Auch ein erneuter Versuch mit Erststrang-cDNA, für deren Synthese mRNA unter Verwendung der entsprechenden genspezifischen Rückwärtsprimer anstelle des 5´-RACE CDS Primers umgeschrieben wurde, blieb erfolglos. Daher wurde eine dritte reverse Transkription mit dem 5´-RACE CDS Primer durchgeführt. Letztlich gelang es mittels der verschiedenen Matrizen und Primer nach wiederholten Reaktionsansätzen bei allen Sequenzen Amplifikationsprodukte der 3´- und 5´-RACE zu erzielen. Eine Ausnahme bildete jedoch die Sequenz L3ni 54, bei welcher mit beiden Primerkombinationen, wie auch schon in der vorangegangenen Primer-Überprüfung, in der RACE kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden konnte.

Nach der Elektrophorese im 2 %igen Agarosegel zeigten die RACE-Produkte einiger differentiell transkribierter Genfragmente eine klare Bande. Bei anderen hingegen traten, unabhängig von der gewählten Primerkombination, mehrere Banden auf. Hierbei wurden diejenigen Banden kloniert, welche die berechnete Mindestlänge der Amplifikationsprodukte überschritten. Bei der Insertkontrolle von jeweils drei Klonen pro Bande zeigten die einzelnen Inserts teilweise Längendifferenzen von bis zu 50 bp. In diesen Fällen erfolgte eine Sequenzierung der jeweils differierenden Inserts. Auf Grund verkürzter oder nicht zur Insertsequenz der Klone komplementärer RACE-Produkte war in einigen Fällen die Klonierung mehrerer Banden erforderlich. Die Anzahl der klonierten Banden sowie die durchgeführten Sequenzierungen, jeweils als Vorwärts- und Rückwärtssequenz, sind in Tab. 3 aufgeführt. Dabei sind wiederholte Klonierungen ein und derselben Bande sowie erneute Sequenzierungen infolge einer nicht zufriedenstellenden ersten Sequenzierung mit berücksichtigt. Der Klon L3i 99 steht stellvertretend für die teilidentischen Klone L3i 18 und L3i 86, der Klon L3i 82 für den teilidentischen Klon L3i 101 und der Klon L3ni 69 für den identischen Klon L3ni 92.

Klon	3´-RACE		5´-RACE	
	klonierte Banden	Sequenzierungen	klonierte Banden	Sequenzierungen
L3ni 16	1	4	1	2
L3ni 22	2	3	2	4
L3ni 51	1	3	1	3
L3ni 56	2	2	1	2
L3ni 67	1	2	3	4
L3ni 69	2	2	1	2
L3i 10	1	2	2	3
L3i 33	3	4	4	7
L3i 53	3	3	1	2
L3i 75	1	2	3	2
L3i 82	2	3	4	5
L3i 88	2	3	5	5
L3i 99	5	5	2	2
L3i 100	1	2	2	2

Tab. 3: Anzahl klonierter Banden und Sequenzierungen der differentiell transkribierten Genfragmente

4.9.4 Erstellung vollständiger Sequenzen der differentiell transkribierten Fragmente

Die cDNA-Fragmente der subtrahierten cDNA-Banken wurden mittels der im Alignment festgestellten Überlappungsbereiche in 3´- bzw. 5´-Richtung um die entsprechenden RACE- bzw. SL1-Sequenzen verlängert.

Die mit dem GSP der **L3ni 22** erhaltenen Sequenzen der 3´-RACE bestanden stets aus 447 untereinander identischen Nukleotiden, von welchen die ersten 193 bp mit dem Insert des Klons L3ni 22 übereinstimmten, nachfolgend war jedoch keine Identität mehr zu beobachten. Wurde neben der 5´-RACE-Sequenz auch die der 3´-RACE an das cDNA-Fragment des Klons angehängt, zeigte sich beim Sequenzidentitätsvergleich mittels BLASTP (s. 4.9.5.2) eine höhere Signifikanz über einen zudem längeren Teilbereich. Des Weiteren glich sich die Anzahl der translatierten Aminosäuren der des homologen Proteins von *C. elegans* an, da die zusammengesetzte Sequenz nun ein Stopcodon enthielt. Daher wird im Folgenden nur die in 5´- und 3´-Richtung verlängerte Sequenz beschrieben, das Aminosäure-Alignment mit der L3ni 22-Sequenz ohne Poly-A-Ende ist unter 9.4.1 abgebildet.

Die Sequenzierung der 3´-RACE-Produkte des Klons **L3ni 56** erbrachte zwei verschieden lange Sequenzen, wobei diese Längendifferenz durch ein Gap in den sonst übereinstimmenden Sequenzen repräsentiert wurde.

Im Zuge der 5`-RACE des Klons **L3i 10** ergaben sich eine 1009 bp sowie eine 987 bp lange Sequenz. Diese zeigten sich ab der Base 171 bzw. 151 identisch, gingen aber mit einer Längenveränderung der translatierten Aminosäuresequenz einher.

Die Sequenzierung der 3´-RACE-Produkte der **L3i 82** respektive **L3i 101** sowie **L3i 88** ergab jeweils zwei in der Länge differierende Sequenzen, wobei dieser Umstand eine Sequenzlücke in den sonst identischen Basenabfolgen bedingte. Zwei solcher Lücken waren des Weiteren beim Vergleich eines 5´-RACE-Produkts der L3i 88 mit den übrigen durch diese RACE erhaltenen Sequenzen zu beobachten. Als Konsequenz daraus ergab sich eine Aminosäuresequenz, deren Stopcodon vor dem Identitätsbereich mit der L3i 88-Sequenz des Klons der subtrahierten cDNA-Bank befindlich war. Diese Sequenz wurde als L3i 88-2 bezeichnet und konnte infolge von Überlappungsbereichen mit der 3´-RACE-Sequenz um das Poly-A-Ende verlängert werden. Die erhaltenen 5´-RACE-Sequenzen der L3i 82 bzw. L3i 101 konnten nur zur Verlängerung der L3i 82 herangezogen werden, da mit der L3i 101-Sequenz nach einem anfänglich überlappenden Sequenzbereich Unstimmigkeiten in 5´-Richtung auftraten.

Die zwei RACE-Sequenzen, welche die Inserts der Klone **L3i 18**, **L3i 86** und **L3i 99** in 5´-Richtung ergänzen sollten, stimmten mit den Sequenzen von L3i 18 bzw. L3i 86 nur soweit überein, wie diese auch mit dem cDNA-Fragment des Klons L3i 99 identisch waren (s. 4.8.2). Daher konnten die Insert-Sequenzen dieser beiden Klone nur in 3´-Richtung ergänzt werden.

Die Sequenzierung der 5´-RACE-Produkte der **L3i 100** ergab eine 565 bp und eine 599 bp umfassende Sequenz. Nach anfänglichen Unstimmigkeiten über 147 bzw. 302 bp waren die beiden Sequenzen, mit Ausnahme eines schon bei der Überprüfung der GSP festgestellten Gaps (s. 4.9.2), untereinander identisch.

Mit Hilfe der SL1-PCR gelang es, für die Sequenzen **L3i 75** und **L3i 33** ein 5´-Ende zu ermitteln. Gleichzeitig wurde damit auch die Existenz der SL1-Sequenz bei *D. viviparus* nachgewiesen.

Tab. 4 gibt die Längen der erstellten Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wieder. Als translatierte Region (TR) sind diejenigen Basen angegeben, welche in Homologien aufweisende Aminosäuresequenzen mit nachfolgendem Stopcodon übersetzt werden konnten, wobei sich diese Angaben auf die Gesamtzahl der translatierten Aminosäuren beziehen. Die Länge der Aminosäuresequenz, welche sich ab dem ersten AUG-Triplett der translatierten Region ergab, ist jeweils in der Spalte „ab Met" angegeben. Zeigten sich Sequenzunterschiede der 3´- respektive 5´-RACE wie beispielsweise in Form von Sequenzlücken, wurden verschiedene Sequenzen generiert. Zudem wurden bei der Zusammensetzung der cDNA-Sequenzen die bei der Überprüfung der genspezifischen Primer erhaltenen verschieden langen Sequenzen der L3ni 56, L3i 33, L3i 75, L3i 82, L3i 88 und L3i 100 berücksichtigt (s. 4.9.2), woraus sich letztlich die Bezeichnungen „a" bis „e" ergeben.

Sequenz	bp	TR	aa	ab Met
L3i 10a	1771	149-1126	325	320
L3i 10b	1782	3-1136	378	377
L3i 33a	1718	42-1607	521	521
L3i 33b	1614	42-1454	470	470
L3i 33c	1874	42-368	108	108
L3i 53	1923	144-1712	522	517
L3i 75a	1743	1-1683	560	552
L3i 75b	1810	1-1404	467	459
L3i 82a	1177	14-916	300	266
L3i 82b	1278	14-736	240	206
L3i 82c	1382	14-709	231	197
L3i 82d	1288	14-718	234	200
L3i 82e	1454	14-652	212	178
L3i 101	1325	90-1064	324	266
L3i 88a	873	38-667	209	177
L3i 88b	929	38-766	242	210
L3i 88c	800	38-637	199	167
L3i 88d	932	38-514	158	126
L3i 88-2	900	38-349	103	71
L3i 18	1518	341-1027	228	199
L3i 86	1515	338-1024	228	199
L3i 99	1423	3-932	309	288
L3i 100a	862	34-699	221	210
L3i 100b	845	71-682	203	184
L3i 100c	739	34-576	180	169

Sequenz	bp	TR	aa	ab Met
L3ni 16	3215	33-2717	894	876
L3ni 22	950	68-766	232	206
L3ni 51	1055	1-897	298	292
L3ni 56a	848	2-751	249	217
L3ni 56b	907	2-685	227	195
L3ni 56c	858	2-613	203	171
L3ni 56d	976	2-511	169	137
L3ni 56e	655	2-508	168	136
L3ni 67	712	2-625	207	123
L3ni 69/ L3ni 92	1033	2-568	188	185

Tab. 4: Sequenzlängen der erstellten Genfragmente (TR = translatierte Region; aa = Gesamtzahl der Aminosäuren; ab Met = Anzahl ab dem ersten Methionin)

Durch das Anfügen der 5´-RACE-Sequenz besaßen die Sequenzen L3ni 22 und L3i 10a sowie alle Isoformen der L3i 33, L3i 82 und L3i 88 ein oder mehr Stopcodons vor der translatierten Aminosäuresequenz. Gleiches konnte bei den Sequenzen L3i 53, L3i 75, L3i 100 und L3i 101 bereits nach der Sequenzierung der in den subtrahierten cDNA-Banken enthaltenen Inserts beobachtet werden (s. 4.8.3.1). Jedoch ergab sich im Alignment der Insertsequenz des Klons L3i 75 mit den beiden Sequenzen der 5`-RACE-Banden, dass dieses Stopcodon durch Fehler der Polymerase oder bei der Plasmidreplikation bzw. der Sequenzierung entstanden sein musste. Den zusammengesetzten Gensequenzen fehlte daher dieses Stopcodon. Die Aminosäuresequenzen der L3i 101 sowie L3i 82a waren ab der 37igsten respektive zwölften Aminosäure identisch. Ebenso wiesen die Klone L3i 18 und L3i 86 mit Ausnahme einer Aminosäure eine Sequenzübereinstimmung auf, welche sich auch auf die letzten 228 Aminosäuren der L3i 99 erstreckte. Die oben beschriebenen Alignments als auch die der verschiedenen Isoformen sind, ebenso wie die jeweiligen Accession-Nummern der Nukleinsäuresequenzen unter 9.4.2 respektive 9.2 aufgeführt.

4.9.5 Sequenzidentitätsvergleiche

4.9.5.1 Sequenzidentitätsvergleich auf Nukleinsäureebene

Mit den differentiell transkribierten Sequenzen, welche durch die RACE-Produkte in 3´- und 5´-Richtung verlängert werden konnten, erfolgte mittels BLASTN ein Identitätsvergleich mit in GenBank (NCBI) publizierten Nukleinsäuresequenzen. Als signifikant wurde dabei ein E-Value von kleiner als 0,001 gewertet. Sequenzidentitäten, welche von den in Kapitel 4.8.3 beschriebenen abweichen, sind im Folgenden aufgelistet, wobei die Accession- bzw. Versionen-Nummern der teilidentischen Sequenzen in Klammern angeführt werden.

Die **L3ni 16**-Sequenz zeigte sich über einen Bereich von 455 Nukleotiden zu 81 % identisch mit dem essentiellen Paramyosin-Gen *UNC*-15 von *C. elegans* (NM_059684.1). Mit dieser mRNA bestand des Weiteren eine Teilidentität von 80 % über 528 bp, 79 % über 494 bp, 82 % über 158 bp und 86 % über 65 bp hinweg. Die zwei erstgenannten Übereinstimmungen konnten auch mit einem weiteren *unc*-15 Gen für Paramyosin und einem Cosmid von *C. elegans* (CEUNC15 und CEF07A5) festgestellt werden. Mit diesen beiden Sequenzen bestand

ferner eine 81 %ige Identität, welche 251 Nukleotide umfasste. Mit dem *unc*-15-Gen zeigten sich weiterhin noch Übereinstimmungen von 83 % über 113 bp, 89 % über 46 bp und 87 % über 41 bp. Letztgenannte Identität fand sich auch mit dem Cosmid, bei welchem sich die Übereinstimmungen jeweils auf den Folgestrang bezogen. Weitere ähnlich signifikante Übereinstimmungen mit Paramyosinsequenzen anderer Organismen, wie *D. immitis*, *C. briggsae*, *B. malayi* und *W. bancrofti* werden an dieser Stelle nicht näher beschrieben.

Auf einer Länge von 173 bp war die Sequenz **L3ni 51** zu 78 % identisch mit der mRNA für den Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins sowie einem Cosmid von *C. elegans* (NM_070441.1 bzw. CEY73F8A). Mit denselben Sequenzen bestand des Weiteren eine 88 %ige sowie 85 %ige Übereinstimmung über 53 bp bzw. 49 bp hinweg, wobei sich die genannten Identitäten bei dem Cosmid auf den Folgestrang bezogen.

Eine 84 %ige Teilidentität über einen 77 Nukleotide umfassenden Sequenzbereich zeigten die zusammengesetzten Sequenzen **L3i 75a** und **L3i 75b** mit einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase A_2 von *C. elegans* (NM_068568.1).

Für die Sequenzen **L3i 100a** und **L3i 100b** ergab sich mit einem Mitglied der Calmodulin-Familie von *C. elegans* (NM_073746.1) eine 82 %ige Übereinstimmung, welche 131 bp umfasste. Mit einem Cosmid desselben Organismus (CEE02A10) bestand über 104 Nukleotide eine Teilidentität von 82 %. Mit der Sequenz L3i 100c konnten keine signifikanten Identitäten festgestellt werden.

4.9.5.2 Sequenzidentitätsvergleich auf Aminosäureebene

Die mit dem Programm Align™Plus übersetzte Aminosäureabfolge der zusammengesetzten Sequenzen wurde auf dieser Ebene mit in GenBank (NCBI) publizierten Proteinen anderer Organismen verglichen. Dieser Sequenzidentitätsvergleich geschah mittels BLASTP mit der gesamten translatierten Aminosäuresequenz sowie ab dem ersten Methionin, dem potentiellen Startcodon. Als signifikante Sequenzhomologie galt dabei ein E-Value von kleiner als 0,001 in Verbindung mit einer mindestens 40 %igen Übereinstimmung über mehr als 45 Aminosäuren. In Tab. 5 sind die signifikanten Ergebnisse des Sequenzidentitätsvergleichs ab dem po-

tentiellen Startcodon in numerischer Reihenfolge der Klone, getrennt nach L3ni bzw. L3i, aufgelistet. Ergaben sich bei der Erstellung der Sequenzen Isoformen, ist hier nur die Sequenz mit dem längsten übereinstimmenden Teilbereich angeführt, die Identitäten der übrigen Isoformen sind unter 9.3 aufgeführt. In Klammern befindlich sind die jeweiligen Sequenzlängen sowie Accession- bzw. Versionen-Nummern der homologen Sequenzen.

	Teilidentische Sequenz	**Teil-bereich**	**Iden-tität**	**Ähn-lichkeit**
L3ni 16:	hypothetisches Protein (872 aa) von *C. briggsae* (CAE66607.1)	873 aa	87 %	89%
	Paramyosin, UNCoordinated locomotion UNC-15 (872 aa) sowie Paramyosin (866 aa) von *C. elegans* (NP_492085.1 und S04027)	873 aa	86 %	89%
	Weitere signifikante Homologien mit Paramyosinen anderer Organismen (z.B. *O. volvolus, B. malayi* und *D. immitis*) werden an dieser Stelle nicht weiter beschrieben.			
L3ni 22:	putatives Protein (222 aa) von *C. elegans* (NP_492899.1)	202 aa	61 %	76 %
L3ni 51:	Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins (294 aa) von *C. elegans* (NP_502842.1)	286 aa	63 %	74 %
L3ni 56a:	putatives Protein bilateralen Ursprungs (232 aa) von *C. elegans* (NP_491869.1)	215 aa	57 %	72 %
L3ni 67:	nukleäres *anchorage* Protein 1 (8545 aa) und nukleäres *anchorage* Proteinfamilie 1-Mitglied (7659 aa) von *C. elegans* (ANC1_CAEEL und NP_491353.1)	123 aa	51 %	60 %
L3ni 69/ L3ni 92:	extrazelluläre Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu-Zn-SOD) (183 aa) von *H. contortus* (CAA93449.1)	171 aa	63 %	74 %
	extrazelluläre Cu-Zn-SOD (221 aa) von *C. elegans* (JE0098)	156 aa	57 %	74 %
	SOD-4 (Cu-Zn) (176 aa) von *C. elegans* (NP_4999091.1)	156 aa	57 %	74 %
	Cu-Zn-SOD (184 aa) von *C. elegans* (S40984)	154 aa	57 %	74 %
	Für weitere signifikante Homologien mit SODs anderer Organismen (z.B. *Zaprionus tuberculatus* und *D. melanogaster*) erfolgt keine Beschreibung.			
L3i 33a/b	hypothetisches Protein (318 aa) von *C. briggsae* (CAE70988.1)	76 aa	50 %	61 %
L3i 53:	Glycerol-Kinase (502 aa) von *C. elegans* (NP_494721.1)	515 aa	67 %	80 %
	hypothetisches Protein CBG18455 (502 aa) von *C. briggsae* (CAE71520.1)	514 aa	67 %	80 %
	Gk2-prov Protein (563 aa) von *X. laevis* (AAH56091.1)	523 aa	48 %	66 %
	Weitere signifikante Homologien mit Glycerol-Kinasen anderer Organismen (z.B. *H. sapiens* und *M. musculus*) werden an dieser Stelle nicht weiter beschrieben.			

Tab. 5: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene

	Teilidentische Sequenz	Teil-bereich	Iden-tität	Ähn-lichkeit
L3i 75a:	Kalzium-unabhängige Phospholipase A_2 (546 aa) von *C. elegans* (NP_500969.1)	503 aa	52 %	69%
	hypothetisches Protein (546 aa) von *C. briggsae* (CAE61557.1)	548 aa	51 %	66%
	Weitere signifikante Homologien Kalzium-unabhängigen Phospholipasen A_2 anderer Organismen (z.B. *H. sapiens* und *M. musculus*) werden hier nicht weiter aufgeführt.			
L3i 82a/ L3i 101:	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (283 aa) von *C. elegans* (NP_505563.1)	254 aa	61 %	74 %
	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase Homolog (315 aa) von *C. elegans* (S27784) → bei dieser Isoform nicht signifikant	227 aa	39%	56 %
	Mitglied der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase-Familie (273 aa) von *C. elegans* (NP_498914.1) → bei dieser Isoform nicht signifikant	248 aa	36 %	56 %
L3i 88a:	Guanylyl-Cyclase (gcy-34) (686 aa) von *C. elegans* (NP_506319.1)	181 aa	53 %	67 %
	gcy-32 (646 aa), lösliche Guanylyl-Cyclase (684 aa) und ein hypothetisches Protein (699 aa) von *C. elegans* (NP_506452.3; CAC35530.1 und T18984)	177 aa	49 %	67 %
	Weitere signifikante Homologien mit Guanylyl-Cyclasen von *C. elegans* und anderen Organismen (z.B. *M. musculus*) mit ähnlichen Identitäts- und Ähnlichkeitsverhältnissen werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.			
L3i 88-2:	Guanylyl-Cyclase (gcy-36) (663aa) und ein hypothetisches Protein (685 aa) von *C. elegans* (NP_510557.2 und T19968)	65 aa	50 %	70 %
	gcy-32 (646 aa), lösliche Guanylyl-Cyclase (684 aa) und ein hypothetisches Protein (699 aa) von *C. elegans* sowie die lösliche Guanylyl-Cyclase 2 beta (406 aa) von *Limax marginatus* (NP_506452.3; CAC35530.1;T18984; BAC80153.1)	66 aa	43 %	65 %
	Weitere signifikante Homologien mit Guanylyl-Cyclasen von *C. elegans* und anderen Organismen (z.B. *R. norwegicus*, *D. melanogaster*) werden hier nicht weiter beschrieben.			
L3i 99:	zwei DM DNA-Bindungsdomänen enthaltende Proteine (510 aa bzw. 470 aa) von *C. elegans* (NP_502770.1 bzw. NP_502771.1)	110 aa	49 %	63 %
L3i 100a:	Mitglied der Calmodulin-Familie (202 aa) von *C. elegans* (NP_506147.1)	181 aa	82 %	90 %
	hypothetisches Protein (201 aa) von *C. briggsae* (CAE75516.1)	181 aa	82 %	90 %
	Weitere signifikante Homologien mit Calmodulin-Sequenzen und hypothetischen Proteinen der oben genannten Organismen werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.			

Tab. 5: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene

Ging die gesamte Aminosäuresequenz in den Identitätsvergleich ein, zeigten sich bei folgenden Sequenzen Veränderungen bezüglich der oben beschriebenen, ab dem ersten Methionin festgestellten Übereinstimmungen: Die **L3ni 67**-Sequenz wies mit den oben genannten Protein-Isoformen von *C. elegans* nun Identitäten über 213 Aminosäuren bei einer Sequenzidentität von 40 % und einer Sequenzähnlichkeit von 50 % auf. Der Gesamtvergleich der **L3i 88**-Sequenzen ergab ebenfalls eine erhöhte Signifikanz. Hierbei waren von 16 direkt vor dem ersten Methionin liegenden Aminosäuren, welche bei allen Isoformen übereinstimmten (s. 9.4.2), neun bzw. zehn Aminosäuren identisch und vier respektive drei weitere iso-funktionell. Mittels dem BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ erhöhte sich diese Zahl auf 29 Aminosäuren mit 19 bzw. 20 identischen und fünf bzw. vier iso-funktionellen Aminosäuren. Wurde die Aminosäuresequenz der **L3i 99** in voller Länge verglichen, erhöhte sich der identische Teilbereich mit den oben genannten Proteinen, welche durch alternatives Spleißen entstehen, auf 135 Aminosäuren. Die Sequenzidentität betrug nunmehr 47 % bei einer Ähnlichkeit von 61 %.

Im Zuge des Sequenzidentitätsvergleichs mittels BLASTP konnten bei den im Folgenden aufgeführten Aminosäuresequenzen keine Identitäten festgestellt werden, die den gestellten Anforderungen an eine Signifikanz genügten: Die **L3i 10a**- sowie **L3i 10b**-Aminosäuresequenzen wiesen als Gesamtsequenz wie auch ab dem potentiellen Startcodon Übereinstimmungen über einen Teilbereich von 265 Aminosäuren mit einem putativen Protein (329 aa) von *C. elegans* (NP_506141.1) auf. Es bestand jedoch nur eine Identität von 33 %, die Sequenzähnlichkeit betrug 51 %. Die **L3i 33c**-Sequenz zeigte eine 30 %ige Identität bei einer Ähnlichkeit von 46 % über 65 Aminosäuren mit einem hypothetischen Protein (1476 aa) von *R. norwegicus* (XP_218479.2) Wurde die Aminosäuresequenz ab dem potentiellen Startcodon verglichen, ergaben sich für die **L3i 18** und **L3i 86** Identitäten mit vier Proteinen (zwei Zink-Finger und zwei hypothetische Proteine) über einen Bereich von lediglich 44 Aminosäuren. Die Teilidentität lag bei 47 %, die Sequenzähnlichkeit betrug 50 %. Die Übereinstimmungen mit den DM DNA-Bindungsdomänen enthaltenden Proteinen, wie sie noch beim Identitätsvergleich mittels des BLAST „*search for short, nearly exact matches*“ und auch weiterhin mit der L3i 99-Sequenz festzustellen waren, traten nicht mehr auf. Beim Vergleich der Aminosäuren ab dem ersten Methionin konnte das BLAST-Programm keine signifikanten Identitäten ermitteln.

4.9.5.3 Überprüfung auf konservierte Domänen

Die Aminosäuresequenzen wurden mittels des RPSBLAST auf das Vorliegen konservierter Domänen (CD) der *conserved domain database* (NCBI) überprüft. Die folgende Tabelle gibt Alignments von mehr als 51 % in Verbindung mit einem E-Value von kleiner als 0,001 wieder. Prozentzahlen bezüglich der Identität werden vom RPSBLAST-Programm nicht angegeben. Neben der Aminosäurelänge der konservierten Region sind die zugehörigen CD-Nummern angegeben. Bei keiner der Sequenzen zeigten sich Identitätsunterscheide, wenn der RPSBLAST mit der Gesamtsequenz bzw. mit der Aminosäuresequenz ab dem potentiellen Startcodon durchgeführt wurde.

konservierte Domäne	Sequenz				
	L3ni 16				
Myosin-Schwanz, 860 aa (pfam01576)	95,5 %				
Smc, Chromosomen trennende ATPasen, 1163 aa (COG1196)	61,4 %				
	L3ni 56a	**L3ni 56b**	**L3ni 56c**	**L3ni 56d**	**L3ni 56e**
nicht charakterisiertes konserviertes Protein 221 aa (KOG3264)	95,5 %	81,0 %	68,3 %	57,0 %	55,2%
verschiedene Cu-Zn-Superoxiddismutasen:	**L3ni 69/92**				
152 aa (pfam00080)	96,1 %				
154 aa (KOG0441)	95,5 %				
179 aa (COG2032)	77,7 %				
	L3i 53				
FGGY-Familie der Karbohydrat-Kinasen 224 aa (pfam02782)	100 %				
Glycerol-Kinase 499 aa (COG0554)	98,8 %				
FGGY-Familie der Karbohydrat-Kinasen 245 aa (pfam00370)	98,8 %				
Ribulose-Kinase und verwandte Karbohydrat-Kinasen 516 aa (KOG2517)	98,4 %				
Zucker-Kinase 502 aa (COG1070)	95,0 %				
Ribulose-Kinase 544 aa (COG1069)	94,1 %				

Tab. 6: Sequenzidentitäten der differentiell transkribierten cDNA-Sequenzen mit konservierten Domänen

konservierte Domäne	Sequenz				
	L3i 75a	**L3i 75b**			
Patatin-ähnliche Phospholipase, 178 aa (pfam01734)	98,9 %	98,9 %			
vorhergesagte Esterase der alpha-beta Hydrolase Superfamilie, 306 aa (COG1752)	95,4 %	57,5 %			
intrazelluläre membrangebundene Kalzium-unabhängige Phospholipase A_2, 326 aa (COG1752)	73,9 %	61,1 %			
vorhergesagte Esterase der alpha-beta Hydrolase Superfamilie, 292 aa (COG4667)	55,8 %	55,8 %			
Patatin, 229 aa (COG3621)	52,8 %	52,8 %			
Nikotinamid-N-, Phenylethanolamin-N- und Thioester-S-Methyltransferase-Familie, 261 aa (pfam01234)	**L3i 82a/101**	**L3i 82b**	**L3i 82c**	**L3i 82d**	**L3i 82e**
	98,9 %	75,5 %	73,6 %	72,4 %	60,5 %
Adenylyl-/Guanylyl-Cyclase, katalytische Domäne, 194 aa (smart00044)	**L3i 88a**	**L3i 88b**	**L3i 88c**	**L3i 88d**	**L3i 88-2**
	51,5 %	51,5 %	51,5 %	51,5 %	n.s.
Proteine der EF-Hand-Superfamilie:	**L3i 100a**	**L3i 100b**	**L3i 100c**		
63 aa (cd00051)	100 %	100 %	90,5 %		
67 aa (cd00052)	100 %	100 %	kein Alignment		
151 aa (KOG0027)	98,7 %	98,7 %	81,5 %		
152 aa (KOG0030)	95,4 %	95,4 %	80,3 %		
160 aa (COG5126)	91,2 %	91,2 %	91,2 %		
171 aa (KOG0031)	85,4 %	85,4 %	85,4 %		
172 aa (KOG0028)	82,6 %	82,6 %	68,0 %		
Weitere signifikante Homologien mit konservierten Domänen von Proteinen der EF-Hand-Superfamilie werden hier nicht weiter beschrieben					

Tab. 6: Sequenzidentitäten der differentiell transkribierten cDNA-Sequenzen mit konservierten Domänen (n.s. = nicht signifikant)

Für alle der oben aufgeführten Sequenzen ergaben sich, mit Ausnahme der L3ni 56 und L3i 53, weitere Identitäten mit konservierten Domänen, die jedoch nicht den gestellten Anforderungen an eine Signifikanz genügten.

4.10 Überprüfung differentiell transkribierter Sequenzen mittels konventioneller PCR

Eine weitere Überprüfung der differentiellen Transkription der cDNA-Sequenzen, welche beim Sequenzidentitätsvergleich signifikante Homologien zeigten, erfolgte mittels konventioneller PCR. In dieser fand neben Zweitstrang- auch Erststrang-cDNA der L3ni und L3i als Template Verwendung. Die im 2 %igen Agarosegel ermittelten Unterschiede der Bandenintensitäten sind in Tab. 7 sowie beispielhaft in Abb. 31 dargestellt. Dabei wird die relative Intensität im Vergleich zur jeweils komplementären cDNA-Population (Driver) angegeben.

	cDNA-Template				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
L3i 10	∅	+	+	+	n.n.
L3i 33	+ +	+	+	+	∅
L3i 53	n.n.	n.n.	+	∅	n.n.
L3i 75	+	+	+	∅	+
L3i 82/101	+ +	+ +	+ +	+ +	+
L3i 88	+ +	+ +	+ +	+ +	+
L3i 99	+ +	∅	+ +	+ +	+
L3i 100	+	+	+	∅	∅

	cDNA-Template				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
L3ni 16	n.n.	+ +	∅	∅	+
L3ni 22	∅	+	–	–	∅
L3ni 51	∅	+	+	+	+
L3ni 56	∅	∅	∅	∅	∅
L3ni 67	∅	+	∅	∅	∅
L3ni 69/92	+ +	+	+	+ +	+

Tab. 7: Intensitätsunterschiede der Banden mit L3ni- bzw. L3i-cDNA-Templates

L3ni- bzw. L3i-Template:

1: doppelsträngige cDNA

2: 3´-RACE-cDNA aus Isolierung 3

3: 5´-RACE-cDNA aus Isolierung 3

4: 5´-RACE-cDNA aus Isolierung 5; 50 µl-Reaktionsansatz mit 30 PCR-Zyklen

5: 5´-RACE-cDNA aus Isolierung 5, 25 µl-Reaktionsansatz mit 35 PCR-Zyklen

Zeichenerklärung:

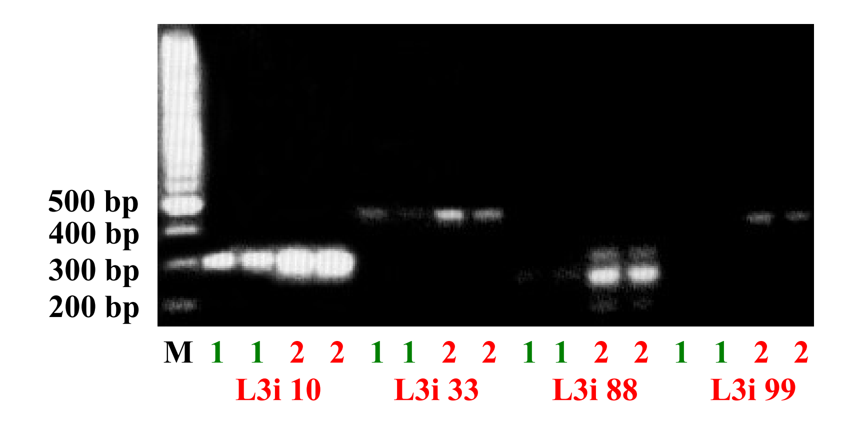
+ +: keine oder kaum sichtbare Banden in der Driver-cDNA

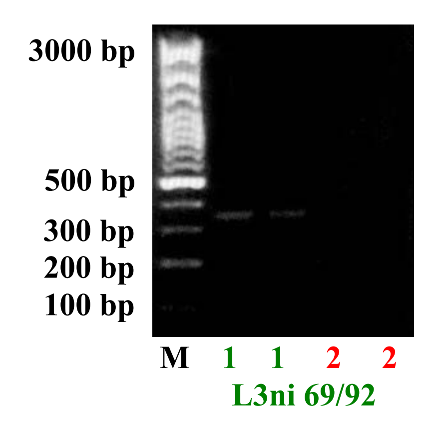
+: schwächere Banden in der Driver-cDNA

∅: keine oder minimale Intensitätsunterschiede zwischen Tester- und Driver-cDNA

–: stärkere Banden in der Driver-cDNA

n.n.: kein Amplifikationsprodukt nachweisbar





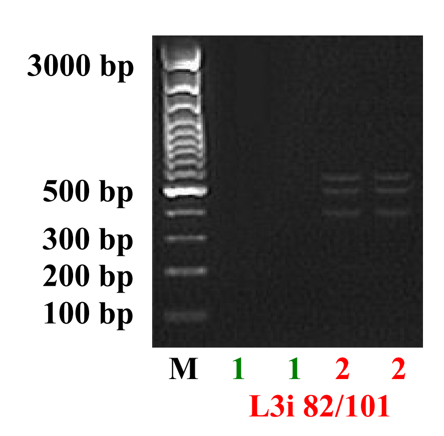


Abb. 31: Differentielle Transkription verschiedener cDNA-Sequenzen

2 %iges Agarosegel

M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

1: L3ni-cDNA

2: L3i-cDNA

Insgesamt ergab sich mittels dieser PCRs, dass bei den cDNA-Sequenzen L3ni 51, L3ni 69/92, L3i 33, L3i 75, L3i 82/101, L3i 88 sowie L3i 99 differentiell transkribierte Gene vorliegen. Bezüglich der L3ni 16, L3i 10 bzw. L3i 100 erscheint eine differentielle Transkription nicht hinreichend eindeutig. Die L3i 53 konnte auf Grund zu geringer Vergleichsmöglichkeiten nicht ausgewertet werden. Im Gegensatz dazu sprechen die Ergebnisse dieser Überprüfung der L3ni 22, L3ni 56 und L3ni 67 gegen eine differentielle Gentranskription. Die Bandenmuster einiger genspezifischer Primerkombinationen, welche zwei respektive drei

Banden im Agarosegel entstehen ließen, wiesen gewisse Besonderheiten auf. So entstand die oberste der drei Banden der L3ni 56, welche der Isoform L3ni 56d entspricht, immer bei dem L3i-cDNA-Template, mit der L3ni-cDNA war sie nur bei einer der fünf Amplifikationsreaktionen nachweisbar. Regelmäßig zeigte sich bei der L3i 75 die untere der zwei Banden (Isoform L3i 75a) bei der L3i-cDNA deutlich stärker, wohingegen die obere Bande nicht immer Intensitätsunterschiede zwischen den beiden Larvenpopulationen aufwies. Die mittlere der drei L3i 88-Banden, auf welcher die Isoform L3i 88a beruht, war bei allen PCR-Produkten der L3i-Templates die prominenteste Bande. Diese erschien auch als einzige bei Verwendung von L3ni-cDNA als Template, wenn im Agarosegel ein Amplifikationsprodukt sichtbar war.

4.11 Quantitative real-time PCR (qPCR) der L3ni 69/92 und L3i 82/100

4.11.1 Charakterisierung eines EF-1α- und β-Tubulin-Genfragments

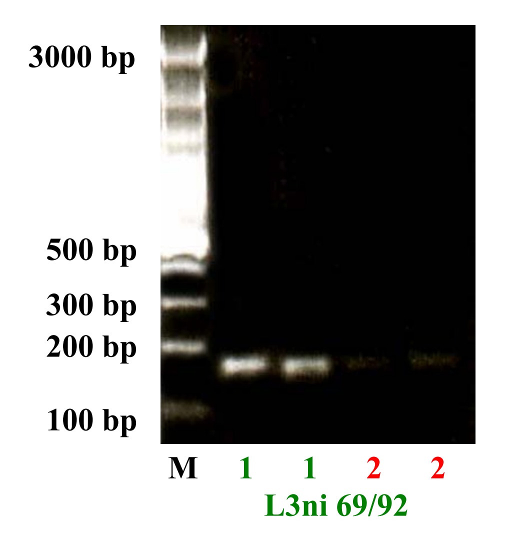
Die Amplifikationsprodukte der mit degenerierten Primern für die *housekeeping*-Gene EF-1α und β-Tubulin amplifizierten L3ni- respektive L3i-cDNA wiesen im 2 %igen Agarosegel Banden der erwarteten Fragmentlänge von ca. 290 bp (EF-1α) bzw. 370 bp (β-Tubulin) auf. Davon wurden jeweils zwei L3i-Klone und ein L3ni-Klon sequenziert. Im Align™ Plus wiesen die 334 bp langen β-Tubulin-Fragmente untereinander eine 100 %ige Übereinstimmung auf. Die 244 bp umfassenden EF-1α-Sequenzen zeigten sich bezüglich der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtssequenzen zu 100 % identisch, der Vergleich der Sequenzen untereinander ergab eine Übereinstimmung von 98 %.

Der Sequenzidentitätsvergleich mit publizierten Sequenzen anderer Organismen erfolgte mittels BLASTN (NCBI). Hierbei wies das β-Tubulin-Fragment über 333 Nukleotide hinweg eine 83 %ige Homologie zu einer β-Tubulin-Sequenz von *Cyathostomum pateratum* (AF487833.1) auf, eine Identität von 82 % bestand über einen Bereich von 274 bp mit *Cylicocyclus nassatus* (AF181092.1). Zudem bestehende Identitäten mit β-Tubulin-Sequenzen weiterer kleiner Strongyliden des Pferdes, Magen-Darm-Strongyliden des Schafes sowie anderen Organismen werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Das EF-1α-Fragment zeigte über einen Teilbereich von 200 bp Identitäten von 86 % mit dem EF-1α-Gen von *Thaumalea gillespieae* (AF003552), mit *Gymnopais fimbriatus* (AF003559) herrschte eine 86 %ige Homologie über 194 Nukleotide hinweg. Weitere signifikante Homologien mit EF-1α-Sequenzen anderer Organismen werden hier nicht näher beschrieben.

4.11.2 Differentielle Transkription unter Bedingungen der qPCR

In diesem Vorversuch wurde die differentielle Transkription der L3ni 69/92 und L3i 82/101 in einer konventionellen PCR überprüft. Hierbei wurden die Reagenzien und das Temperaturprofil der qPCR mit TaqMan™-Sonden verwendet. Nach der anschließenden Elektrophorese der jeweiligen Doppelansätze konnten im 2 %igen Agarosegel Banden der erwarteten Fragmentlängen von ca. 170 bp (L3ni 69/92) sowie 185 bp (L3i 82/101) sichtbar gemacht werden. Diese Banden zeigten sich sowohl beim entsprechenden Tester- als auch Driver-cDNA-Template, jedoch waren mit der jeweiligen Tester-cDNA die Banden deutlich intensiver.



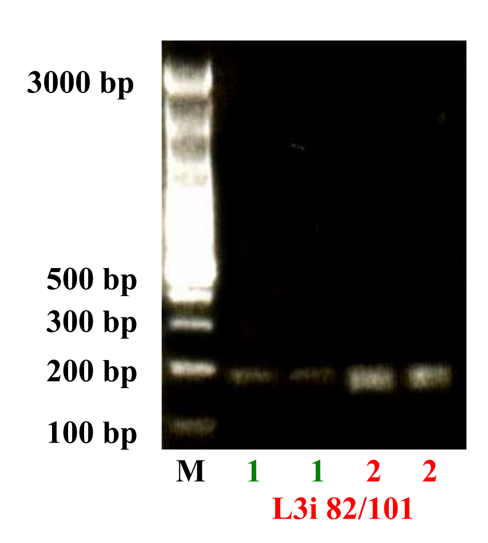


Abb. 32: Differentielle Transkription der L3ni 69/92 und L3i 82/101

2 %iges Agarosegel

M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

1: L3ni-cDNA

2: L3i-cDNA

4.11.3 qPCR mit TaqMan™-Sonden

Durch die qPCR mit TaqMan™-Sonden konnten keine Ergebnisse hinsichtlich einer differentiellen Transkription der L3ni 69/92 bzw. L3i 82/101 erzielt werden. Bereits beim Einsatz der Plasmid-Verdünnungsreihen als Template scheiterte zunächst die selektive Amplifikation. Es entstand im 2 %igen Agarosegel sowohl bei den oben genannten Sequenzen als auch bei EF-1α ein multiples Bandenmuster. Nachdem mit einer Primercharge nur Fragmente der erwarteten Längen amplifiziert werden konnten, erwiesen sich Detektion und Quantifizierung als unzureichend. Gelang mit einer Sondencharge die Signaldetektion, wobei die Sonde EF-1α besondere Schwierigkeiten bereitete, lag die Sensitivität bei maximal 10^3 Kopien. Des Weiteren ergaben sich innerhalb der Duplikate oftmals Differenzen um bis zu zwei Cycle threshold (Ct)-Werte. Wurde ein solcher Lauf unter Verwendung derselben Aliquots wiederholt, waren die erhaltenen Werte nicht reproduzierbar, in den meisten Fällen konnte nunmehr keine über den Threshold hinausgehende Fluoreszenzemission detektiert werden.

4.11.4 qPCR mit TaqMan™-MGB-Sonden

Da es mittels der qPCR mit TaqMan™-Sonden nicht gelang, verwertbare Ergebnisse zu erzielen, wurden in einem erneuten Versuch TaqMan™-MGB-Sonden eingesetzt. Diese erwiesen sich als weitaus besser geeignet als die TaqMan™-Sonden, jedoch missglückte auch hier, in Abhängigkeit von der Sondencharge und wiederholter Verwendung eines Sondenaliquots, bei einigen Läufen die Signaldetektion. Hinsichtlich der Sensitivität, welche anhand der Plasmid-Verdünnungsreihen ermittelt wurde, ergaben sich in den auswertbaren Läufen für die TaqMan™-MGB-Sonden folgende Kopienzahlen:

Sonde SOD-MGB: 10^1 Kopien, in zwei Läufen nur 10^2 Kopien
Sonde NMT-MGB: 10^1 Kopien, in einem Lauf nur 10^3 Kopien
Sonde EF-1α : 10^2 Kopien, in einem Lauf 10^1 Kopien

Beim Einsatz der je fünf verschiedenen L3ni- bzw. L3i-Erststrang-cDNAs in Verdünnungsstufen (als unverdünntes sowie 10fach und 100fach verdünntes Template) konnte bei einigen

Läufen nicht die erwartete Erhöhung um drei Ct-Werte pro Verdünnungsstufe festgestellt werden, vielmehr ergaben sich Variationen zwischen zwei und vier Ct-Werten. Dementsprechend unterschieden sich auch bei Quantifizierung die Kopienzahlen der jeweiligen Sequenzen hierbei nicht um den Faktor zehn.

Abb. 33 zeigt beispielhaft den Amplification Plot eines Laufs mit L3ni- bzw. L3i-cDNA. Hierbei sind die Ct-Werte der EF-1α- und L3ni 69/92 (SOD)-Sequenz für beide Templates nahezu gleich. Bei der Sequenz L3i 82/101 (PNMT) hingegen wurde mit dem L3i-Template drei Zyklen früher ein über die Hintergrundfluoreszenz hinausgehendes Signal detektiert. Dies entspricht einer zehnfach erhöhten Kopienzahl im Vergleich zu dem L3ni-Template.

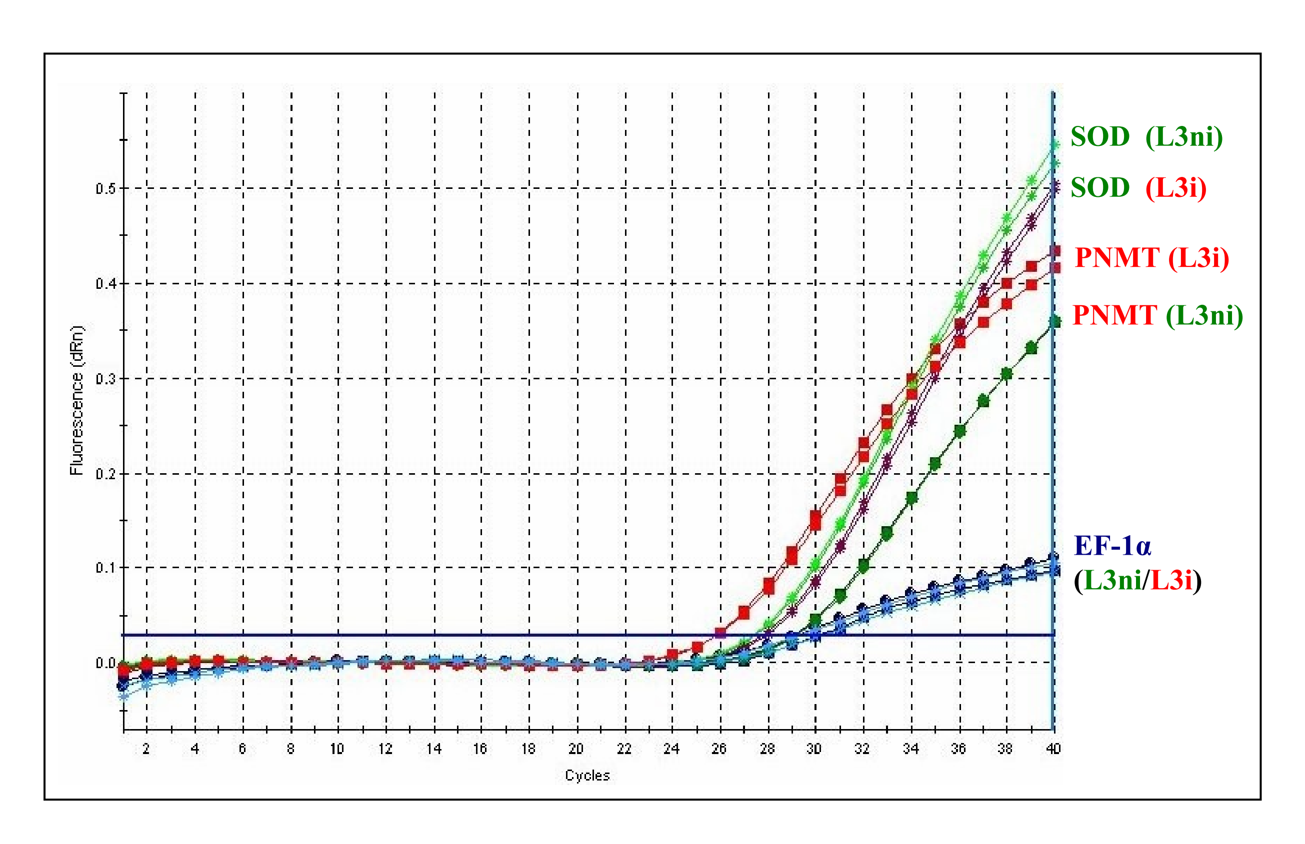


Abb. 33: Amplification Plot eines L3ni- und L3i-Templates

In Tab. 8 und 9 sind die Ergebnisse der qPCR unter Verwendung der unverdünnten Templates dargestellt. Dabei sind die Ct-Werte und Kopienzahlen der Duplikate jeweils als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen und Variationskoeffizenten angegeben. Zur

Normalisierung der Transkriptionsrate zwischen den beiden Larvenpopulationen wurde zudem berechnet, wie viele L3ni 69/92- respektive L3i 82/101-Kopien auf eine EF-1α-Kopie entfallen.

In der qPCR verwendete Templates:

cDNA 1: Erststrang-cDNA 1 aus Isolierung 6

cDNA 2: Erststrang-cDNA 2 aus Isolierung 6

cDNA 3: 5´-RACE-cDNA aus Isolierung 5

cDNA 4: 3´-RACE-cDNA aus Isolierung 3

cDNA 5: 5´-RACE-cDNA aus Isolierung 3

cDNA	L3i 69/92						EF-1α						L3i 69/92-Kopien pro EF 1α-Kopie
	Ct	SD	CV	Kopien	SD	CV	Ct	SD	CV	Kopien	SD	CV	
L3i 1	29,02	0,63	2,2 %	120970	31155,12	25,8 %	30,59	0,25	0,8 %	107895	13724,94	12,7 %	1,121
L3i 1	29,87	0,08	0,3 %	6000,5	385,37	6,4 %	31,18	0,01	0,0 %	13260	84,85	0,6 %	0,453
L3i 1	29,79	0,17	0,6 %	3868,5	464,57	12,0 %	30,12	0,17	0,6 %	8540	1038,03	12,2 %	0,453
L3i 2	27,35	0,06	0,2 %	4240	200,82	4,7 %	29,74	0,05	0,2 %	15550	537,40	3,5 %	0,273
L3i 2	27,47	0,00	0,0 %	4706,5	14,85	0,3 %	29,70	0,17	0,6 %	20845	2255,67	10,8 %	0,226
L3i 2	31,06	0,14	0,5 %	2421,5	252,44	10,4 %	32,62	0,66	0,2 %	5790	2240,11	38,9 %	0,418
L3i 2	30,87	0,46	1,5 %	1811,5	594,68	32,8 %	31,44	0,08	0,3 %	3308	183,85	5,6 %	0,548
L3i 2	32,71	0,04	0,1 %	273,2	7,07	2,6 %	32,41	0,14	0,4 %	1246	113,14	9,0 %	0,219
L3i 3	27,15	0,20	0,7 %	12025	1590,99	13,2 %	26,81	0,73	2,7 %	46045	20668,73	44,,9 %	0,261
L3i 3	28,98	0,29	1,0 %	9289	1726,76	18,6 %	29,37	0,23	0,8 %	37485	5154,81	13, %8	0,249
L3i 3	29,41	0,07	0,2 %	5834	244,66	4,2 %	28,45	0,06	0,2 %	40365	1647,56	4,1 %	0,145
L3i 4	29,48	0,06	0,2 %	21675	1053,59	4,9 %	28,55	0,48	1,7 %	58000	17097,84	29,5 %	0,374
L3i 4	27,97	0,13	0,5 %	6878	622,25	9,0 %	24,56	0,19	0,8 %	183350	22556,71	12,3 %	0,038
L3i 5	29,27	0,52	1,8 %	2924,5	1016,11	34,7 %	25,13	1,15	4,6 %	144420	96845,34	67,0 %	0,020
L3i 5	29,87	0,28	0,9 %	15590	3733,52	23,9 %	27,03	0,37	1,4 %	146900	33092,60	22,5 %	0,106
L3i 5	29,12	0,19	0,7 %	4348	726,91	16,7 %	24,49	0,10	0,4 %	241800	16122,03	6,7 %	0,018
L3ni 1	32,88	0,54	1,6 %	24095	5324,51	22,1 %	30,15	0,17	0,6 %	134850	11950,10	8,9 %	0,179
L3ni 1	30,68	0,14	0,5 %	3101,5	280,72	9,1 %	29,65	0,35	1,2 %	31815	6682,16	21,0 %	0,097
L3ni 1	29,63	0,19	0,6 %	4348	610,94	14,1 %	28,47	0,39	1,4 %	28225	7742,82	27,4 %	0,154
L3ni 2	29,10	0,21	0,7 %	1572,5	224,15	14,3 %	30,11	0,03	0,1 %	16155	346,48	2,1 %	0,097
L3ni 2	31,01	0,02	0,1 %	1584,5	23,33	1,5 %	29,68	0,23	0,8 %	11725	1930,40	16,5 %	0,132
L3ni 2	31,63	0,01	0,0 %	1678,5	10,61	0,6 %	31,23	0,38	1,2 %	12120	2828,43	23,3 %	0,138
L3ni 3	29,23	0,12	0,4 %	6554,5	511,24	7,8 %	27,88	0,05	0,2 %	58830	2093,04	3,6 %	0,111
L3ni 3	28,21	0,14	0,5 %	15190	1371,79	9,0 %	28,88	0,25	0,9 %	50805	7629,68	15,0 %	0,299
L3ni 3	27,69	0,43	1,6 %	8500	2474,87	29,1 %	27,33	1,56	5,7 %	39390	33743,14	85,7 %	0,216
L3ni 4	29,65	0,35	1,2 %	19070	5614,43	29,4 %	28,64	1,15	4,0 %	60625	39661,62	65,4 %	0,315
L3ni 4	29,23	0,04	0,1 %	3941	137,18	3,5 %	25,99	0,05	0,2 %	87780	2658,72	3,0 %	0,045
L3ni 5	29,10	0,02	0,1 %	29940	608,11	2,0 %	27,91	0,31	1,1 %	85030	16023,04	18,8 %	0,352
L3ni 5	27,80	0,13	0,5 %	13930	1640,49	11,8 %	24,17	0,05	0,2 %	298600	9192,39	3,1 %	0,047
L3ni 5	28,92	0,51	1,8 %	3696,5	1249,46	33,8 %	25,70	0,91	3,5 %	96180	52495,61	54,6 %	0,038

Tab. 8: **Quantitative real-time PCR der Sequenz L3ni 69/92** (SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient)

cDNA	L3i 82/101						EF-1α						L3i 82/101-Kopien pro EF 1α-Kopie
	Ct	SD	CV	Kopien	SD	CV	Ct	SD	CV	Kopien	SD	CV	
L3i 1	24,27	0,12	0,5 %	164200	13010,76	7,9 %	30,59	0,25	0,8 %	107895	13724,94	12,7 %	1,522
L3i 1	26,40	0,15	0,6 %	11355	1096,02	9,7 %	30,11	0,08	0,3 %	7522,5	396,69	5,3 %	1,509
L3i 1	26,70	0,18	0,7 %	15400	1838,48	11,9 %	28,89	0,27	0,9 %	18280	3295,12	18,0 %	0,842
L3i 2	28,39	0,07	0,2 %	5177	220,62	4,3 %	31,08	0,19	0,6 %	4077,5	531,04	13,0 %	1,270
L3i 2	27,91	0,55	2,0 %	1640	586,90	35,8 %	32,41	0,14	0,4 %	1246	113,14	9,0 %	1,316
L3i 2	28,22	0,10	0,4 %	3573	222,03	6,2 %	31,46	0,07	0,3 %	3174	141,42	4,5 %	1,126
L3i 3	23,61	0,50	2,1 %	27805	9043,90	32,5 %	26,81	0,73	2,7 %	46045	20668,73	44,9 %	0,604
L3i 3	23,82	0,07	0,3 %	34625	1548,56	4,5 %	28,45	0,06	0,2 %	40365	1647,56	4,1 %	0,858
L3i 4	23,05	0,12	0,5 %	108400	8626,70	8,0 %	25,70	0,24	0,9 %	185300	28708,54	15,5 %	0,585
L3i 4	22,41	0,13	0,6 %	59660	5091,17	8,5 %	24,56	0,19	0,8 %	183350	22556,71	12,3 %	0,322
L3i 5	24,03	0,04	0,2 %	57405	1463,71	2,5 %	25,31	0,09	0,4 %	236450	12940,05	5,5 %	0,243
L3i 5	23,55	1,07	4,5 %	31705	20753,58	65,5 %	25,13	1,15	4,6 %	144420	96845,34	67,0 %	0,220
L3ni 1	30,40	0,45	1,5 %	2634	793,37	30,1 %	30,15	0,17	0,6 %	134850	11950,10	8,9 %	0,020
L3ni 1	30,34	0,07	0,2 %	319,6	14,14	4,4 %	29,30	0,99	3,4 %	9894	5863,33	59,3 %	0,032
L3ni 1	31,81	0,06	0,2 %	568,25	21,28	3,7 %	29,29	0,38	1,3 %	13990	3620,39	25,9 %	0,041
L3ni 1	30,95	0,03	0,1 %	625	10,47	1,7 %	28,97	0,26	0,9 %	15570	2531,44	16,3 %	0,040
L3ni 2	32,11	0,09	0,3 %	1306,5	78,49	6,0 %	30,11	0,03	0,1 %	16155	346,48	2,1 %	0,081
L3ni 2	32,43	0,07	0,2 %	378,8	17,96	4,7 %	29,62	0,15	0,5 %	11020	1159,66	10,5 %	0,034
L3ni 2	31,81	0,35	1,1 %	365,95	81,95	22,4 %	29,86	0,26	0,9 %	8828	1432,60	16,2 %	0,041
L3ni 3	27,79	0,88	3.2 %	1872,5	1031,67	55,1 %	27,33	1,56	5,7 %	39390	33743,14	85,7 %	0,048
L3ni 4	27,55	0,13	0,5 %	5946,5	499,92	8,4 %	25,97	0,02	0,1 %	155550	1626,35	1,0 %	0,038
L3ni 5	27,22	0,18	0,7 %	7356,5	873,28	11,9 %	25,35	0,21	0,8 %	231350	31041,99	13,4 %	0,032

Tab. 9: **Quantitative real-time PCR der Sequenz L3i 82/101** (SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient)

Wie aus den Tab. 8 und 9 ersichtlich ist, konnte auch mit den TaqMan™-MGB-Sonden keine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit erreicht werden. Vielmehr variierten die Variationskoeffizienten der drei untersuchten Sequenzen in Abhängigkeit von der Sondencharge sowie der wiederholten Verwendung und dem damit verbundenen Auftauen der Sondenaliquots bzw. der Templates. Aber auch innerhalb der einzelnen Duplikate ergaben sich teilweise sehr hohe Standardabweichungen respektive Variationskoeffizienten, wodurch die Beurteilung der Ergebnisse zusätzlich erschwert wurde. Insgesamt zeigte sich jedoch eine deutliche differentielle Transkription der Sequenz L3i 82/101, da auf eine EF-1α-Kopie bei den Hypobiose induzierten Larven sehr viel mehr L3i 82/101-Kopien entfallen als bei den nicht induzierten Larven. Dahingegen ergibt sich, bezogen auf EF-1α, für die L3ni 69/92-Sequenz in den Hypobiose induzierten Larven eine leicht erhöhte Transkriptionsrate im Vergleich zu den nicht induzierten Larven, was den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit widerspricht. Mit Hilfe des Computerprogramms SigmaStat Version 2.0 (JANDEL SCIENTIFIC, San Rafael, USA) wurde die Relation der Zielsequenz-Kopien zu den jeweiligen EF-1α-Kopien statistisch ausgewertet. Dabei erfolgte die Überprüfung auf signifikante Korrelationen für die normalverteilten Daten der L3ni 69/92 mittels des t-Tests, wohingegen die nicht normalverteilten Daten der L3i 82/101 mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet wurden. Anhand der gemittelten Daten aus den Tab. 8 und 9 (s. Tab. 10) ergibt sich für die Sequenz L3i 82/101 eine statistisch signifikante 21,33fach höhere Kopienzahl in den L3i ($p = <0,001$). Die Unterschiede in den L3ni 69/92-Kopienzahlen (1,96fach in den L3i erhöht) sind mit einem p-Wert von 0,063 hingegen nicht signifikant.

	L3i82/101			**L3ni 69/92**		
cDNA	**Kopien/ EF-1α-Kopie**	**SD**		**Kopien / EF-1α-Kopie**	**SD**	
L3i	0,87	0,48	$p = <0,001$	0,31	0,27	$p = 0,063$
L3ni	0,04	0,02		0,16	0,10	

Tab. 10: Statistische Analyse der Transkriptionsraten in Bezug auf EF-1α
(SD = Standardabweichung)

Eine relative Quantifizierung konnte für keine der beiden Sequenzen erfolgen, da eine annähernd gleiche PCR-Effizienz der jeweiligen Ziel- sowie EF-1α-Sequenz nicht gegeben war.

4.12 *daf*- und *age*-1 spezifische PCR

Bei dem frei lebenden Nematoden *C. elegans* wirken unter anderem die *daf*-Gene sowie das *age*-1-Gen hemmend bzw. fördernd auf den Prozess der Entwicklungshemmung. Mit insgesamt 35 Primerpaaren, welche anhand von 11 publizierten *daf*-Gensequenzen sowie der *age*-1 Gensequenz aus verschiedenen Exonbereichen ausgewählt bzw. von RICKLING (1999) übernommen wurden, sollte das Vorkommen dieser Gene bei *D. viviparus* untersucht werden. Dies geschah durch Amplifikation genomischer DNA adulter Lungenwürmer mit den genspezifischen Primerpaaren, wobei jede Reaktion im Doppelansatz erfolgte. Nach Durchführung der PCR wurden die Proben auf 2 %igen Agarosegelen analysiert. Dabei zeigte sich lediglich bei der Primerkombination *daf*-1 eine einzelne Bande unter UV-Beleuchtung, welche auch der erwarteten Fragmentlänge von ca. 380 bp entsprach. Alle anderen Primerkombinationen ließen multiple Banden entstehen. Es wurde jeweils die Bande der erwarteten Fragmentlänge sowie weitere, besonders prominente Banden kloniert, so dass letztlich 83 verschiedene Amplifikationsprodukte der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR einer Sequenzierung unterlagen.

4.12.1 Sequenzidentitätsvergleich auf Nukleinsäureebene

Die Genfragmente, welche unter Verwendung der *daf*- und *age*-1 spezifischen Primerkombinationen amplifiziert worden waren, wurden auf Nukleinsäureebene (BLASTN) auf Identitäten mit bereits GenBank (NCBI) veröffentlichten Sequenzen anderer Organismen überprüft. Signifikante Identitäten sind im Folgenden beschrieben, wobei eine Übereinstimmung über einen Teilabschnitt von mindestens 40 bp vorausgesetzt wurde. Die Nummer des jeweiligen Klons gibt dabei die verwendete Primerkombination an, die Accession- bzw. Versionen-Nummern der homologen Sequenzen sind in Klammern aufgeführt.

Das 176 bp lange Insert des Klons ***daf*-16A-u** zeigte eine 86 %ige Übereinstimmung über einen 137 bp langen Teilbereich sowie eine 90 %ige Übereinstimmung über 63 Nukleotide mit dem Klon RP42-550C12 von *Bos taurus* (AC087843.2). Ähnliche Sequenzidentitäten über denselben Teilbereich wurden mit anderen bovinen Klonen (AC087860.2, AC092496.3, AC090961.2, AC089992.2) sowie der „*X-inactivation center region, Jpx and Xist genes*“ und dem pankreatischen, anionischen Trypsinogen-Gen von *B. taurus* (AJ421481.1 bzw.

AF453325.1) beobachtet. Des Weiteren lag eine 81 %ige Übereinstimmung über einen 106 bp langen Sequenzabschnitt mit dem prp-Gen für das Prionprotein des genannten Organismus (AJ298878.1) vor. Mit dem Prionprotein-Gen von *Ovis aries* (U67922.1) bestand eine Teilidentität von 83 % über 79 bp sowie von 100 % über 23 bp hinweg. Weitere signifikante Identitäten werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Das ebenfalls mit dem *daf*-16A-Primerpaar generierte Insert des Klons ***daf*-16A-o** zeigte sehr ähnliche Identitäten wie *daf*-16A-u. So bestand auf einer Länge von 158 bp respektive 38 bp mit dem Klon RP42-550C12 von *B. taurus* (AC087860.2) eine Teilidentität von 84 % bzw. 89 %. Die weiteren Identitäten glichen ebenfalls im Wesentlichen denen des Klons 16A-u.

Das Insert ***daf*-12-o**, welches eine Länge von 228 bp aufwies, war über einen Bereich von 80 Nukleotiden zu 98 % mit der Transfer RNA-Met 3 sowie zwei Cosmiden von *C. elegans* (M25474.1, U46668.1 sowie U41549.1) identisch. Eine 100%ige Übereinstimmung, die sich über 73 bp erstreckte, bestand mit weiteren Met-tRNAs und Cosmiden von *C. elegans* (z.B. M25472.1 und M25473.1). Des Weiteren zeigten sich ähnliche Identitäten mit Initiator- oder Varianten-Met-tRNAs der verschiedensten Organismen, wie z. B. *X. laevis*, *Salmo salar*, *H. sapiens* und *D. melanogaster*.

Eine 92 %ige, 50 Nukleotide umfassende Teilidentität bestand zwischen dem Insert des Klons ***daf*-19-o**, welches eine Länge von 110 bp aufwies, und drei olfaktorischen Rezeptoren von *M. musculus* (AY318609.1, AY073213.1 und NM_146877.1).

Eine 86 %ige Sequenzidentität, welche einen Bereich von 53 bp überspannte, wurde bei der 326 bp langen Insertsequenz ***daf*-12B-o** mit zwei transkribierten Sequenzen für „*fizzy-related*“ Proteine von *X. laevis* (BC045037.1, Y14163.1) festgestellt.

Der Klon ***daf*-4A-M**, dessen Insert aus 317 bp bestand, zeigte auf einer Länge von 52 Nukleotiden eine Teilidentität von 84 % mit einer kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase von *C. elegans* (NM_058779.1).

Eine 84 %ige, 52 Nukleotide umfassende Übereinstimmung zeigte das 317 bp lange Insert ***daf*-4A-u** mit dem Cosmid Y47G6A von *C. elegans* (AC024791.1).

4.12.2 Sequenzidentitätsvergleich auf Aminosäureebene

Die 83 Sequenzen der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR wurden mittels TBLASTX (NCBI) und mit den in GenBank (NCBI) enthaltenen Proteinen verglichen. Dabei zeigten drei Amplifikationsprodukte signifikante Homologien, wobei neben der Identität die Sequenzähnlichkeit in Klammern angegeben ist. Mit dem Programm Align Plus™ wurde die Nukleinsäuresequenz dann in die entsprechenden Aminosäuren übersetzt und nochmals unter Verwendung des BLAST „*for short, nearly exact matches*" auf Homologien mit Aminosäuresequenzen anderer Organismen, deren Accession- bzw. Versionen-Nummern in Klammern aufgeführt sind, verglichen.

Das 34 Aminosäuren umfassende Insert des Klons ***daf*-4A-M** zeigte sich auf einer Länge von 26 Aminosäuren zu 96 % identisch (100 %) mit zwei kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen sowie dem hypothetischen Protein von *C. elegans* (NP_491180.1, NP_491181.2 sowie AAK29888.2). Mit CG31549-PA von *D. melanogaster* (NP_730972.2) bestand eine 81 %ige Teilidentität (92 %) über 27 Aminosäuren. Auch mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren dieses Organismus (z.B. NP_649563.1 und NP_569875.2) bestanden signifikante Sequenzidentitäten.

Das Insert des Klons ***daf*-12B-o** beinhaltete eine 77 Aminosäuren lange Sequenz. Diese war über ein 25 Aminosäuren langes Teilstück zu 92 % identisch (96 %) mit dem „*fizzy related*" Protein von *C. elegans* (NP_496075.1). Mit ENSANGP00000017686 von *A. gambiae* (XP_320924.1) bestand eine Teilidentität von 57 % (65 %) über 40 Aminosäuren hinweg.

Der Klon ***daf*-16** besaß eine in 100 Aminosäuren translatierbare Insertsequenz. 61 dieser Aminosäuren waren zu 54 % identisch (67 %) mit einem „*RNase H integrase-like protein family member*" von *C. elegans* (NP_490700.1). Mit einem hypothetischen Protein desselben Organismus (T31583) bestand eine 41 %ige Identität (52 %) über 89 Aminosäuren hinweg.

Letztlich zeigte keine der 83 Sequenzen der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR Homologien mit den *daf*-Genen bzw. dem *age*-1 Gen von *C. elegans*.

4.12.3 Überprüfung der Sequenzen 16Au und 12o

Mit dieser PCR sollte überprüft werden, ob es sich bei den ermittelten Sequenzen *daf*-16A-u und *daf*-12-o um Lungenwurm- oder Wirts-DNA handelt. Genomische DNA dritter *D. viviparus*-Larven diente als Template, als Primer wurden neben den ursprünglich verwendeten Primerkombinationen *daf*-12 und *daf*-16A zusätzlich je ein Insertsequenz-spezifisches Primerpaar (*daf*-12RNA und *daf*-16prp) eingesetzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte konnten beim Einsatz der Insert-spezifischen Primerkombinationen *daf*-12RNA und *daf*-16prp keine Banden der erwarteten Fragmentlänge von 51 bp bzw. 143 bp dargestellt werden. Weiterhin gelang es nicht, unter Verwendung des Primerpaares *daf*-12 die ca. 100 bp umfassende Bande der PCR mit genomischer DNA adulter Lungenwürmer zu reproduzieren. Mit der Primerkombination *daf*-16A war es bei der Verwendung genomischer Larven-DNA möglich, zwei Produkte zu amplifizieren, die sich in etwa auf der Höhe der ursprünglich klonierten Banden *daf*-16A-u und *daf*-16A-o befanden. Diese mit genomischer DNA der dritten *Dictyocaulus*-Larven entstandenen Banden wurden kloniert und sequenziert. Im BLASTN ließen sich jedoch die in Kapitel 4.12.1 aufgeführten Sequenzhomologien dieser Inserts nicht verifizieren.

5 Diskussion

Der Nematode *D. viviparus*, der große Lungenwurm des Rindes, besitzt die Fähigkeit, bei Einwirkung bestimmter Umweltbedingungen seine Entwicklung im Wirtsorganismus für einen gewissen Zeitraum zu unterbrechen. Diese Entwicklungshemmung wird auch als Hypobiose oder Diapause bezeichnet. Während dieser Zeit verbleiben die Parasitenstadien an ihrem Ansiedlungsort in der Lunge, ohne durch Immunmechanismen des Wirtes eliminiert zu werden. Die betroffenen Tiere zeigen dabei, als auch nach der Weiterentwicklung der inhibierten Stadien zu sich reproduzierenden Adulten, keine klinischen Symptome und tragen daher zur unerkannten Verbreitung der Lungenwürmer bei. Untersuchungen an anderen, ebenfalls zur Hypobiose befähigten Organismen wie dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* lassen erkennen, dass dieses Phänomen auf einer genetischen Grundlage basiert und durch Einwirkung äußerer Faktoren induziert respektive moduliert wird.

Zur Steuerung der Lebensprozesse werden zu jedem bestimmten Zeitpunkt nur 10 bis 15 % der insgesamt vorhandenen Gene eines Organismus exprimiert, wobei für jedes Entwicklungsstadium sowie Änderungen des Zellstoffwechsels ein zustandsspezifisches, charakteristisches Genexpressionsmuster besteht. Durch vergleichende Untersuchungen von mRNA-Populationen Hypobiose induzierter und nicht induzierter dritter *D. viviparus*-Larven könnten somit Erkenntnisse über die genetische Regulation der Entwicklungshemmung gewonnen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Hypobiosefähigkeit des etablierten *D. viviparus*-Laborstammes überprüft. Es folgte anschließend die vergleichende Untersuchung der Gentranskription Hypobiose induzierter (L3i) und nicht induzierter (L3ni) dritter Lungenwurmlarven. Zu diesem Zweck wurde isolierte mRNA beider Larvenpopulationen in cDNA umgeschrieben und die darin befindlichen differentiell transkribierten Sequenzen mittels der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) angereichert. Es schloss sich die Erstellung subtrahierter L3ni- und L3i-cDNA-Banken an. Zur Verifizierung der in diesen Banken enthaltenen Klone wurde neben dem Differential Screening auch ein Southern dot blotting durchgeführt. Die cDNA-Inserts, welche als differentiell transkribiert bestätigt werden konnten, wurden nach der Sequenzierung einem Identitätsvergleich mit bereits publizierten Se-

quenzen anderer Organismen unterzogen. Die Komplettierung der differentiell transkribierten cDNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) sowie einer *spliced leader* 1 (SL1)- spezifischen PCR. Die so vervollständigten Sequenzen gingen wiederum in einen Sequenzidentitätsvergleich ein.

Mittels der quantitativen real-time PCR (qPCR) sollte eine Bestimmung der Transkriptionsrate zweier ausgewählter cDNA-Sequenzen in Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten *D. viviparus*-Larven erreicht werden.

Abschließend wurde auf der Ebene von genomischer DNA überprüft, ob bei *D. viviparus* Homologe solcher Gene vorhanden sind, die bei dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* in die Regulation der Entwicklungshemmung involviert sind. Für diese Untersuchung wurden spezifische Primerpaare verschiedener *daf*-Gene und des *age*-1 Gens eingesetzt.

5.1 Überprüfung der Hypobiosefähigkeit des Laborstammes

Die Induktion der Hypobiose durch mehrwöchige Kühlung infektiöser Larven bei 4 °C konnte für verschiedene Spezies der Trichostrongyliden (BLITZ u. GIBBS 1972a; ARMOUR u. BRUCE 1974; ARMOUR 1978; EYSKER 1981a) sowie für *D. viviparus* (PFEIFFER 1976; INDERBITZIN 1976) nachgewiesen werden. PFEIFFER (1976) und INDERBITZIN (1976) konnten nach experimenteller Infektion gekühlter *D. viviparus*-Larven bis zu 98 % entwicklungsgehemmte Stadien isolieren, welche eine Länge von weniger als 5 mm aufwiesen. Infektionsversuche von RICKLING (1999) mit Hypobiose induzierten Lungenwurmlarven ergaben bei Tötung der Wirtstiere am 16. bzw. 42. Tag *p.i.* 0,4 bis 0,6 mm bzw. 3 bis 5 mm lange gehemmte Stadien. Gleiche Verhältnisse lagen bei eigenen Untersuchungen vor. Nach Infektion zweier Kälber mit 20 000 Hypobiose induzierten *D. viviparus*-Larven und Tötung der Tiere am 27. bzw. 42. Tag *p.i.* wurden 0,45 bis 3 mm bzw. 1 bis 3 mm lange, hypobiotische Entwicklungsstadien isoliert. Dahingegen konnten bei dem am 27. Tag *p.i.* getöteten Kalb, welches mit 3000 ungekühlten und somit nicht Hypobiose induzierten Larven infiziert worden war, nur adulte Parasiten mit einer Länge von 3 bis 7 cm aus der Lunge entnommen werden. Auch RICKLING (1999) fand nach Infektion mit ungekühlten Larven nur solche Stadien, deren Entwicklung über das präadulte Stadium hinausging.

Diese Vorversuche belegen neben der Hypobiosefähigkeit des etablierten *D. viviparus*-Laborstammes auch die Möglichkeit der experimentellen Induktion der Hypobiose und stellen die Basis der nachfolgenden molekulargenetischen Untersuchungen bezüglich der genetischen Regulation der Entwicklungshemmung dar.

5.2 Suppression Subtractive Hybridization

Auf Grund der beschränkten Menge an Ausgangsmaterial erfolgte nach der reversen Transkription der mRNA eine Amplifikation der Erststrang-cDNA in Form einer Long Distance (LD) PCR. Die Verwendung amplifizierter cDNA bedingt jedoch eine erhöhte Hintergrundreaktion in den späteren PCRs der Suppression Subtractive Hybridization (SSH). Ferner besteht die Gefahr, dass einige der Sequenzen verloren gehen, weshalb eine Präamplifikation der mRNA nach Möglichkeit unterbleiben sollte (DIATCHENKO et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1999). Um das Problem einer unerwünschten selektiven Amplifikation bestimmter Sequenzen zu umgehen und eine hoch repräsentative cDNA bei gleichzeitig guter Qualität zu erhalten, wurde die Amplifikationsreaktion vor Erreichen der Plateauphase beendet. Als ein Kriterium zur Beurteilung der cDNA-Qualität dient die Länge der resultierenden cDNA-Fragmente. Die mittels der SMART™-Technik synthetisierte cDNA wies in der Gelelektrophorese einen Größenbereich von bis zu 5000 bp auf. Daran gemessen, dass die durchschnittliche Größenverteilung der cDNA für andere als Säugetierspezies oftmals nur 500 bis 3000 bp beträgt, konnte von einer guten Qualität der hergestellten cDNAs ausgegangen werden. Unklar blieb, inwieweit die cDNA die einzelnen mRNA-Spezies repräsentierte. Nach ZHUMABAYEVA et al. (2001) ist die SMART™-Methode bei gleichzeitiger Restriktion auf die exponentielle Amplifikationsphase jedoch gut geeignet zur Synthese hoch repräsentativer cDNA.

Bei der weiteren Durchführung der SSH erwiesen sich die nach dem Herstellerprotokoll des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD CLONTECH) einzusetzenden cDNA-Mengen als ungenügend. So wurde die nötige cDNA-Konzentration von mindestens 300 ng/µl für die Adapterligation erst erreicht, als nach der LD PCR mit der dreifachen der angegebenen cDNA-Menge fortgefahren wurde. Erklärbar ist dies durch die mehrfachen Aufreinigungs-

und Konzentrationsschritte, welche jeweils mit einem Verlust an cDNA einhergehen. Auch BECK et al. (2001) stellten fest, dass die in verschiedenen Protokollen angeführte Ausgangsmenge von 1 bis 4 µg mRNA (DIATCHENKO et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1999; STEIN 2001) für die cDNA-Synthese ohne zusätzlichen Amplifikationsschritt unzureichend ist. Die Autoren geben eine benötigte Ausgangsmenge von mindestens 10 µg mRNA an. STEIN (2001) sieht in einer unvollständigen Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I einen weiteren kritischen Punkt für das Gelingen der SSH und empfiehlt statt eines Verdaus von ein bis zwei Stunden Dauer eine Inkubation über Nacht. Bei eigenen Untersuchungen war nach einer vierstündigen Restriktionsenzymspaltung bei allen Proben ein deutlicher Wechsel in der Größenverteilung der cDNA-Fragmente ersichtlich, des Weiteren konnte im Agarosegel eine Oligonukleotid-Bande visualisiert werden. Somit erscheint eine vier Stunden andauernde Inkubation des Reaktionsansatzes als ausreichend.

Bei der Analyse der Adapterligationseffizienz konnte mit dem genspezifischen L3-Primerpaar, dessen Bandenintensität als Referenz für eine mindestens 25 %ige Ligationseffizienz dienen sollte, im Gegensatz zur Kombination von genspezifischem Vorwärtsprimer und adapterspezifischem Primer (ligationsspezifisches Primerpaar) zunächst kein PCR-Produkt dargestellt werden. Bei dem genspezifischen Primerpaar handelt es sich um eine Primerkombination aus der *daf*-spezifischen PCR und somit um von *C. elegans* abgeleitete Sequenzen. Dabei ist nicht bekannt, ob in der *D. viviparus*-cDNA Sequenzabschnitte vorliegen, die mit diesen Primersequenzen zu 100 % übereinstimmen. Die geringere Amplifikationsrate des genspezifischen Primerpaares beruht daher wahrscheinlich auf einer weniger effizienten Bindung der genspezifischen Primer an die cDNA-Matrize im Gegensatz zu dem sequenzidentischen Adapterprimer. Gestützt wird die Annahme einer weniger spezifischen Bindung durch den im Agarosegel festgestellten „Schmier“. Die Tatsache, dass beim Einsatz des ligationsspezifischen Primerpaares Banden nach weniger PCR-Zyklen als mit dem genspezifischen Primerpaar darstellt werden konnten, wurde als zufrieden stellende Effizienz der Ligationsreaktion gewertet.

Die bei der gelelektrophoretischen Untersuchung der Suppression PCR festgestellte unterschiedliche Größenverteilung und Intensität der Amplifikationsprodukte der subtrahierten und nicht subtrahierten Proben sowie das Auftreten schwacher Banden bei den subtrahierten Pro-

ben lieferten erste Hinweise auf eine differentielle Gentranskription der L3ni und L3i. Der Erwartung zufolge sollten sich die beobachteten Unterschiede im Zuge der Nested PCR verstärken, jedoch näherten sich die jeweiligen subtrahierten und nicht subtrahierten Proben in ihrem gelelektrophoretischen Bild einander an. Dies könnte durch eine Hintergrund-Amplifikation, wie sie oftmals bei der Verwendung mittels RT-PCR synthetisierter cDNA auftritt, bedingt sein (DIATCHENKO et al. 1999). Auch sind zu viele Suppression bzw. Nested PCR-Zyklen (STEIN 2001; YOKOTA et al. 2001) respektive ein unspezifisches Annealing mit nachfolgender Elongation der PCR-Primer sowie nicht ligierter Adapter als mögliche Ursachen zu bedenken (REBRIKOV et al. 2000). Des Weiteren muss eine ungenügende Effizienz der Ligations- oder subtraktiven Hybridisierungsreaktionen in Betracht gezogen werden, wobei erstere nach den Ergebnissen dieser Arbeit zumindest für die Kontrolle (humane Skelettmuskulatur) sicher ausgeschlossen werden kann. Gleiches gilt für eine ungenügende Subtraktionseffizienz im Hinblick auf die beiden Larvenpopulationen der Durchführung 1. Bei dieser Durchführung ging jeweils die vierfache der im Protokoll angegebenen Drivermenge in die subtraktive Hybridisierungsreaktion ein. Dahingegen war bei der Durchführung 2, die mit der empfohlenen Menge an Driver angesetzt wurde, die Subtraktionseffizienz nicht zufrieden stellend. Diese Durchführung wies bereits bei der Suppression und Nested PCR weniger deutliche Unterschiede zwischen den subtrahierten und nicht subtrahierten Proben auf. Im Zuge dieser Arbeit stellte sich somit das im Herstellerprotokoll vorgesehene Verhältnis von Tester und Driver als nicht ausreichend für eine effiziente Subtraktion heraus.

5.3 Subtrahierte cDNA-Banken

Die mit der L3ni-cDNA erstellte subtrahierte cDNA-Bank wurde von 104 Klonen, die der L3i von 105 Klonen repräsentiert, wobei die Inserts der jeweiligen Banken eine Länge von 200 bp bis 2200 bp aufwiesen. Diese durch die Restriktionsenzymspaltung mit *Rsa*I bedingte Größenverteilung entspricht im Wesentlichen dem von YOKOTA et al. (2001) angegebenen Bereich von 100 bp bis 2000 bp. Dahingegen stellten YANG et al. (1999) eine durchschnittlichen Insertlänge von lediglich 50 bp bis 1000 bp fest. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten subtrahierten cDNA-Banken beinhalteten nur sehr wenige Klone mit einer Länge von weniger

als 500 bp, was die Beobachtung von SCHNEIDER et al. (2001) hinsichtlich einer Bevorzugung längerer differentiell transkribierter Fragmente durch die SSH zu bestätigen scheint.

5.4 Differential Screening und Southern dot blotting

Da die mittels der SSH-Technik erstellten subtrahierten cDNA-Banken immer auch eine gewisse Anzahl an falsch positiven Klone enthalten, ist ein Screening dieser Banken unerlässlich (YE u. CONNOR 2000; YOKOTA et al. 2001). Die von verschiedenen Autoren angegebenen Prozentsätze verifiziert differentiell transkribierter Klone variieren in diesem Zusammenhang von 94 % (STEIN 1997) bis unter 10 % (BREITENBACH et al. 2001; CHAN et al. 2002). STUBBS et al. (1999) und REBRIKOV et al. (2000) führen eine hohe Zahl falsch positiver Klone auf geringe Differenzen zwischen den zu vergleichenden Populationen zurück. Im Rahmen eigener Untersuchungen konnten mit Hilfe des Differential Screenings 42,3 % (44 Klone) der 104 Klone der subtrahierten L3ni-cDNA-Bank als differentiell transkribiert angesehen werden, bei der L3i-cDNA-Bank galt dies für 55,2 % (58 Klone) der 105 Klone. Nach dem Southern dot blotting verblieben, gemessen an der Gesamtheit der Klone der jeweiligen subtrahierten cDNA-Bank, 21,2 % (22 Klone) L3ni-Klone und 24,8 % (26 Klone) der L3i-Klone als verifiziert differentiell transkribierte Genfragmente. Auf Grund der beim Differential Screening offensichtlichen Unterschiede beim Vergleich der Signalintensitäten der L3ni- bzw. L3i-Klone nach der Hybridisierung mit subtrahierter L3ni- respektive L3i-cDNA war diese vergleichsweise geringe Zahl an positiven Klonen unerwartet. YE und CONNOR (2000) stellten fest, dass sich im Northern Blot regelmäßig die Klone als falsch positiv herausstellten, welche beim vorangegangenen Screening sehr starke oder schwache Signale aufwiesen. Nach Meinung der Autoren kann eine vom Normalbereich abweichende Signalintensität daher als Indikator für einen falsch positiven Klon angesehen werden. Dieser Zusammenhang wurde auch im Rahmen dieser Arbeit bei der Verifizierung mittels Southern dot blotting des Öfteren beobachtet.

5.5 Charakterisierung ausgewählter differentiell transkribierter Genfragmente

5.5.1 Überprüfung der genspezifischen Primer

Die insgesamt 19 verifiziert differentiell transkribierten Genfragmente der subtrahierten cDNA-Banken, welche beim Sequenzidentitätsvergleich mittels BLAST signifikante Übereinstimmungen aufwiesen, sollten mit Hilfe der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) vervollständigt werden.

Zuvor erfolgte eine Überprüfung der ausgewählten genspezifischen Primerpaare. Hierbei konnte mit den zwei Primerpaaren für den Klon L3ni 54 trotz wiederholter Versuche kein PCR-Produkt dargestellt werden. Dies könnte durch die Auswahl suboptimaler Primer respektive einer ungeeigneten Primerkombinationen bedingt sein. Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass es sich bei dem L3ni 54-Fragment um eine Kontamination der in der SSH verwendeten L3ni-cDNA handelt oder die reverse Transkription der L3ni 54 auf Grund eines sehr raren Sequenzaufkommens unzureichend war. Für einen der letztgenannten Punkte als mögliche Ursache spricht die schwache Signalintensität dieses Klons beim Differential Screening und das Ausbleiben von Signalen im Zuge des Southern dot blotting, bei welchem cDNA-Sonden aus frisch isolierter mRNA eingesetzt wurden. Eine Degradation der mRNA, welche der RACE zugrunde lag, ist unwahrscheinlich, da sich dieses Problem nur bei der L3ni 54-Sequenz ergab.

Einige der genspezifischen Primerpaare ergaben bei der gelelektrophoretischen Auftrennung zwei oder drei statt der erwarteten einen Bande. Bei den hieraus erhaltenen Sequenzen waren im Alignment regelmäßig eine oder mehr Sequenzlücken der sonst identischen Basenabfolgen zu beobachten. Dieser Umstand, der des Öfteren auch bei den RACE-Sequenzen festgestellt werden konnte, ist auf ein alternatives Spleißen der mRNAs zurückzuführen, welches in Kapitel 5.5.4 diskutiert werden sollen.

5.5.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Bei der Durchführung der RACE gestaltete sich insbesondere die 5´-RACE als schwierig. So waren wiederholte Versuche nötig, um von allen differentiell transkribierten Genfragmenten

ein Amplifikat zu erhalten, welches die jeweils erwartete Mindestlänge überschritt. Als Ursachen für diese Problematik sind neben degradierter mRNA vor allem sehr lange Transkripte und stabile Sekundärstrukturen infolge GC-reicher Regionen am 5´-Ende zu nennen, wodurch sowohl die reverse Transkription als auch die nachfolgende Amplifikation beeinträchtigt werden (FROHMAN et al. 1988; FROHMAN 1993; MATZ et al. 1999; DAS et al. 2001).

Beim Identitätsvergleich mit den entsprechenden Insert-Sequenzen der Klone waren insbesondere verschiedene 3´-RACE-Sequenzen der L3i 33 und L3i 53 kürzer als die Insert-Sequenz. Nach FROHMAN (1993) sind verkürzte 3´-Enden auf ein Annealing des Oligo(dT)-Primers an interne A-reiche Regionen statt an das Poly-A-Ende zurück zu führen. Als Ursache für diese Fehlhybridisierung nennt der Autor die relativ niedrige Temperatur und den Primerüberschuss während der reversen Transkription. Diese unvollständigen 3´-Enden können in manchen Fällen durch das Unterschreiten der erwarteten Fragment-Mindestlänge oder das Fehlen eines Stopcodons in der translatierten Aminosäureabfolge ermittelt werden. Einen weiteren Hinweis liefert das Fehlen des Polyadenylierungssignals (DAS et al. 2001). Bei diesem Signal handelt es sich um eine hoch konservierte mRNA-Sequenz mit der Basenabfolge 5´-AAUAAA-3, welches bei über 88 % der mRNAs die Voraussetzung für das Anhängen der Adenosin-Nukleotide bildet (WELSH et al. 1990; SCHÄFER 1992). Diese hoch konservierte Sequenz konnte in der vorliegenden Arbeit bei 50 % der Sequenzen (L3ni 16, L3ni 22, L3ni 56, L3ni 69/92 sowie L3i 53, L3i 82/101 und L3i 100) festgestellt werden.

5.5.3 Komplettierung der differentiell transkribierten cDNA-Sequenzen

Mit Hilfe der RACE und SL1-spezifischen PCR konnten die Transkripte L3ni 16, L3ni 22, L3ni 51, L3ni 56, L3ni 69/92 sowie L3i 10, L3i 53, L3i 75, L3i 82/101 und L3i 100 als *full-length* cDNA-Sequenzen erstellt werden. So beginnen beim Sequenzidentitätsvergleich mittels BLASTP die Übereinstimmungen spätestens ab der 31. Aminosäure der jeweiligen homologen Proteine. Ferner entspricht deren Länge in etwa den translatierten Aminosäuresequenzen der differentiellen Gentranskripte. Auch bezüglich der L3i 18/86, welche im BLAST keine signifikanten Homologien aufwies, kann von einer vollständig vorliegenden cDNA-Sequenz ausgegangen werden.

Im Fall der L3ni 22 bestand das 3´-RACE-Produkt stets aus 447 Nukleotiden, welches nach 193 bp nicht mehr mit der Insert-Sequenz des Klons L3ni 22 übereinstimmte. Wurde die 3´-RACE-Sequenz an das cDNA-Fragment des Klons angefügt, zeigte sich im BLASTP mit dem homologen Protein eine höhere Übereinstimmung über einen zudem längeren Teilbereich. Da der translatierte Leserahmen der L3ni 22-Sequenz nun auch ein Stopcodon enthielt, ergab sich ferner eine nahezu identische Länge der Aminosäuresequenz (206 aa) mit der des homologen Proteins (202 aa). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass diese mit dem Poly-A-Ende erstellte Sequenz der L3ni 22 den wirklichen Verhältnissen entsprach. Das falsche 3´-Ende der Insert-Sequenz beruht vermutlich auf einer Fehlhybridisierung mit nachfolgender Extension während einer der vielen Amplifikationsreaktionen, die zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken erforderlich waren.

Es gelang jedoch nicht, alle Genfragmente mittels der RACE und SL1-spezifischen PCR zu komplettieren. So zeigten die L3ni 67-, L3i 88- und L3i 99-Sequenzen beim Sequenzidentitätsvergleich auf Aminosäureebene längere Teilidentitäten, wenn statt der Sequenz ab dem ersten Methionin die gesamte translatierte Aminosäuresequenz in den BLASTP einging. Auf Grund dieser erhöhten Identitäten in Verbindung mit jeweiligen Sequenzlänge der entsprechenden homologen Proteine ist davon auszugehen, dass es nicht gelang, das gesamte 5´-Ende dieser Sequenzen zu ermitteln. Für eine unvollständige Nuklein- und damit Aminosäuresequenz der L3ni 67, L3i 88 und L3i 99 spricht weiterhin die bestehende Sequenzübereinstimmung mit den jeweiligen C-terminalen Bereichen der homologen Proteine. Da die mRNA des L3ni 67-Homologs 22 980 Nukleotide umfasst, ist eine Komplettierung dieser Sequenz mittels der RACE respektive SL1-spezifischen PCR unwahrscheinlich. Bezüglich der L3i 88-Sequenzen ist anzumerken, dass sich in dem gewählten Leserahmen ein Stopcodon vor der translatierten Aminosäuresequenz befindet. Diese Tatsache spricht gegen ein unvollständiges 5´-Ende. Gemessen an der Länge der homologen Guanylyl-Cyclasen von mindestens 646 Aminosäuren im Gegensatz zu maximal 209 Aminosäuren der verschiedenen L3i 88-Sequenzen, scheint es sich bei dem Stopcodon vermutlich um einen Fehler in der Nukleinsäuresequenz zu handeln. SAIKI et al. (1988) schätzen die Fehlerwahrscheinlichkeit der *Taq*-Polymerase pro Nukleotid und Zyklus bei 20 PCR-Zyklen auf 2x 10^{-4}, FROHMAN et al. (1988) geben eine Fehlerrate von 0,1 % für die gesamte Amplifikationsreaktion an. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Mix aus *Taq*- und *proofreading* Polymerase ist die Fehlerwahr-

scheinlichkeit allerdings um ein Vielfaches geringer. Ferner sind hinsichtlich des Fehlens oder des falschen Einbaus eines Nukleotids Fehler bei der reversen Transkription, Plasmidreplikation und Sequenzierung in Betracht zu ziehen.

5.5.4 Transkriptvarianten

Bei der Zusammensetzung der einzelnen cDNA-Fragmente wurden neben differierenden Sequenzen der RACE auch die sich aus der Überprüfung der genspezifischen Primerpaare ergebenden Sequenzen berücksichtigt. Nach GALAS (2001) existieren von jedem Gen durch alternatives Spleißen und der damit einhergehenden Kombination unterschiedlicher Exons mindestens zwei oder drei verschiedene Transkriptvarianten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für die differentiell transkribierten Sequenzen L3i 10, L3i 33, L3i 75, L3i 82/101 L3i 88, L3i 18/86/99 und L3i 100 sowie L3ni 56 beobachtet werden. Über das alternative Spleißen erfolgt eine quantitative Regulation der Genexpression, welche durch eine Variabilität in den untranslatierten Regionen der mRNA und damit einhergehender veränderter mRNA-Stabilität und Translationseffizienz bedingt ist. Des Weiteren wird durch die Entstehung von Isoformen die Mannigfaltigkeit der Proteine erhöht und eine Modulation der Proteinfunktion ermöglicht (SMITH et al. 1989). Dabei können die translatierten Proteine, beispielsweise durch den Ausschluss bestimmter funktioneller Gruppen, sehr stark in ihrer Funktion verändert oder gar inaktiv sein (SMITH et al. 1989; GRAVELEY 2001; MODREK u. LEE 2002). Dies scheint, bezogen auf die Übereinstimmungen im Sequenzidentitätsvergleich und die Aminosäurelänge der entsprechenden homologen Proteine und Isoformen, insbesondere auf die Sequenzen L3i 18/86, L3i 33c und L3i 88-2 zuzutreffen. So besitzt die L3i 88-2 die höchste Übereinstimmung mit einer anderen Guanylyl-Cyclase als die übrigen L3i 88-Isoformen, was auf eine differente Funktion dieser Isoform hindeutet. Die L3i 18/86-Sequenzen wiesen im BLASTP Teilidentitäten zu anderen Proteinen als die L3i 99 auf, welche zudem nur in geringem Maße signifikant waren. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Verlust der Proteinfunktion. Letzteres kann auch für die Isoform L3i 33c angenommen werden, welche keine signifikanten Homologien zeigte.

FROHMAN (1993) gibt jedoch zu bedenken, dass durch variierende RACE-Sequenzen unter Umständen cDNA-Fragmente generiert werden können, die *in vivo* nicht existieren. Daher sollte mit Primern aus den äußersten Endbereichen der cDNAs die Existenz der zusammengesetzten Sequenzen überprüft werden, was in der vorliegenden Arbeit noch nicht erfolgt ist.

5.5.5 Translation der differentiell transkribierten Sequenzen

Bei der Übersetzung der erhaltenen *full-length* cDNAs in die jeweilige Aminosäuresequenz wurde bei den Sequenzen L3ni 22, L3i 10a, L3i 18/86, L3i 53 und L3i 100b auf Grund der im BLASTP festgestellten Homologien nicht das erste AUG-Triplett der Nukleinsäuresequenz als Translationsstartpunkt gewählt. Dabei können Abweichungen von der „ersten AUG Regel" verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Folgt auf das erste AUG-Triplett nach bis zu 30 Codons ein Terminationscodon, kann die 40 S Untereinheit des Ribosoms an der mRNA verbleiben und die Translation an einem späteren AUG-Codon erneut starten (KOZAK 1987c; LUUKKONEN et al. 1995; KOZAK 1999). An diesem ist die Reinitiation am effizientesten, wenn eine gewisse Entfernung zu dem Terminationscodon des vorherigen Leserahmens besteht (KOZAK 1987c). Dies konnte bei Sequenzen L3ni 22 und L3i 100b festgestellt werden.

Ferner beobachtete KOZAK (1987a), dass die das AUG-Triplett flankierenden Sequenzen dessen Erkennung als Initiationscodon beeinflussen. Den optimalen Kontext für den Start der Translation repräsentiert bei Vertebraten die Konsensus-Sequenz GCCRCCaugG. Befindet sich dabei an Position – 3 ein A respektive G oder an den Positionen – 3 und + 4 ein G, erfolgt die Initiation der Translation, unabhängig von den restlichen in der Konsensus-Sequenz vorliegenden Nukleotiden, nahezu immer an diesem AUG-Codon, da es sich hier um die wichtigsten Positionen der Konsensus-Sequenz handelt (KOZAK 1986b; KOZAK 1987b). Liegt beim ersten AUG-Triplett ein suboptimaler Kontext vor, resultiert daraus das so genannte *leaky scanning*, bei welchem die Translation meist erst am zweiten AUG-Codon gestartet wird (KOZAK 1986b; KOZAK 1987b; KOZAK 1987c). Über die Konsensus-Sequenz parasitischer Nematoden liegen bislang keine Kenntnisse vor. Wird daher von der Vertebraten-Konsensus-Sequenz auf parasitische Nematoden extrapoliert, ergibt sich für das erste

AUG-Triplett der Sequenzen L3ni 22 und L3i 53 ein suboptimaler Kontext. Auf die Möglichkeit, dass am ersten AUG-Codon der Translationsstart durch ein A oder G an den Positionen – 3 bzw. + 4 auch bei *D. viviparus* erzwungen werden könnte, deutet die Analyse der ab diesem Triplett translatierten *full-length* cDNA-Sequenzen hin. So besitzen die L3ni 51-, L3ni 69/92- und L3i 82/101-Sequenzen an Position – 3 ein A, die L3i 82/101 trägt zudem noch ein G an Position + 4. Bei den L3ni 56-Sequenzen befindet sich an diesen Positionen jeweils ein G. Dieses G existiert bei den Sequenzen L3ni 16 und L3i 10b hingegen nur an Position – 3, an welcher es die Translationseffizienz weniger stark beeinflusst als ein A (KOZAK 2002). Bei den Sequenzen L3i 100a und 100c ist allein an Position + 4 ein G befindlich. Für eine eventuelle Bedeutung dieser Nukleotide bezüglich der Translationseffizienz spricht weiterhin, dass das ausgewählte Startcodon der L3i 53, welches vom zweiten AUG-Codon der Nukleinsäuresequenz repräsentiert wird, an Position – 3 ein A und an + 4 ein G besitzt.

Auch beeinflussen die das AUG-Triplett umgebenden Sekundärstrukturen die Translationseffizienz, da diese eine Verlangsamung des Ribosoms bedingen und so zur besseren Erkennung des Initiationscodons beitragen (KOZAK 1986a). Bezüglich der L3i 10a und L3i 18/86 kann eine Bindung des Ribosoms an eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (PELLETIER u. SONENBERG 1988) vermutet werden, da sich stromaufwärts des als Startpunkt ausgewählten Tripletts mehrere AUG-Codons befinden.

5.6 Differentiell transkribierte Gene bei *D. viviparus*

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der differentiell transkribierten Gene der Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten *D. viviparus*-Larven wiesen beim Sequenzidentitätsvergleich signifikante Homologien mit Proteinen anderer Organismen und mitunter auch konservierten Domänen auf. In diesem Kapitel soll die mögliche Bedeutung der Aufregulation dieser Gentranskripte, welche im folgenden auch als L3ni- respektive L3i-assoziiert bezeichnet werden, im Hinblick auf die mögliche Bedeutung bei der Regulation der inhibierten und nicht inhibierten Entwicklung und damit verbundenen Vorgängen des Zellstoffwechsels diskutiert werden. Diesbezüglich werden ferner Analogien und Unterschiede zu *C. elegans* erläutert. Bei diesem frei lebenden Erdnematoden konnten JONES et al. (2001) mit Hilfe der SA-

GE 533 Transkripte ermitteln, die nicht in der *dauer larva* transkribiert werden. Dahingegen ordneten die Autoren 358 Transkripte als *dauer larva*-spezifisch ein. Für Letztgenannte stellten WANG u. KIM (2003) unter Verwendung von DNA Microarrays sogar 540 spezifische Gene fest.

Hinsichtlich der differentiellen Gentranskription ist jedoch anzumerken, dass das Transkriptionsprofil nicht in allen Fällen auch mit dem Proteinprofil korreliert ist (GRIFFIN et al. 2002). So können für viele Gene signifikante Unterschiede bezüglich der vorliegenden Menge an Transkript und korrespondierendem Protein festgestellt werden. Ein Grund hierfür ist die variierende, sequenz- und strukturspezifische Halbwertszeit der verschiedenen Transkripte im Hinblick auf die Degradierung durch RNasen (NEVINS 1983; WANG et al. 2002). Auf der Stufe der Proteinsynthese regulieren verschiedene Faktoren vorrangig die Initiation der Translation, in geringerem Umfang auch die Elongation und Termination (PROUD 1986). Ferner wird die Funktion der translatierten Proteine durch deren Modifikation sowie intermolekulare Interaktionen reguliert (GRIFFIN et al. 2002).

5.6.1 L3ni-assoziierte Gene

Die aufregulierten Gentranskripte der nicht Hypobiose induzierten Larven wiesen signifikante Homologien zu extrazellulären Kupfer-Zink-Superoxiddismutasen (L3ni 69/92), Paramyosinen (L3ni 16), nukleären *anchorage* Proteinen (L3ni 67), dem Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins (L3ni 51), einem putativen Protein bilateralen Ursprungs (L3ni 56) und einem weiteren putativen Protein (L3ni 22) auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wird bei *C. elegans* die zu *D. viviparus* homologe extrazelluläre Kupfer-Zink- sowie eine mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase (SOD) in verstärktem Maße in der *dauer larva* transkribiert (LARSEN 1993; TAWE et al. 1998; JOHNSON 2001; JONES et al. 2001). Diese Tatsache könnte mit der Funktion der SOD, nämlich der Umwandlung von Superoxid zu molekularem Sauerstoff und Hydrogenperoxid und damit dem Schutz des Organismus vor Schäden durch freie Sauerstoffradikale erklärt werden. Als Hauptquellen für die Entstehung dieser Oxidantien gelten die mitochondriale Respiration sowie aktivierte Phagozyten (HADAS u. STANKIEWICZ 1998; GEMS 1999).

Bei der *C. elegans dauer larva* wirkt die gesteigerte Aktivität dieser Superoxiddismutasen einer oxidativen Schädigung entgegen und ermöglicht so den nicht alternden Status (LARSEN 1993; TAWE et al. 1998). Allerdings werden die intrazelluläre Kupfer-Zink- und eine weitere Mangan-SOD in der *C. elegans dauer larva* nicht verstärkt transkribiert (JOHNSON 2001). Bei parasitischen Nematoden hingegen dient die SOD der Abwehr der im Zuge des „*oxidative burst*“ von den Phagozyten freigesetzten Sauerstoffradikalen. Die sezernierte SOD wird daher auch als „*immune defense protein*“ bezeichnet (CALLAHAN et al. 1990; BROPHY et al. 1995) und spielt eine wichtige Rolle für das Überleben des Parasiten im Wirt (KNOX u. JONES 1992). Die differentielle Transkription der extrazellulären Kupfer-Zink-Superoxiddismutase bei den *D. viviparus*-Larven könnte auf die unterschiedliche Immunreaktion des Wirtsorganismus zurückgeführt werden. So persistieren hypobiotische Lungenwurmstadien über Monate ohne erkennbare Zellinfiltration an ihrem Ansiedlungsort, wohingegen ungehemmte Stadien in den Lungen betroffener Tiere eine starke zelluläre Reaktion auslösen (SCHNIEDER et al. 1991).

Für das differentiell transkribierte Paramyosin-Gen, welches zu dem Paramyosin-Gen *unc*-15 von *C. elegans* Homologien aufweist, kann ursächlich eine unterschiedliche Aktivität der L3ni bzw. L3i angenommen werden. Nach BRENNER (1974) existieren bei *C. elegans* zwei primäre Muskeltypen. Dies sind die der Lokomotion dienenden Körperwandmuskeln und die zur Nahrungsaufnahme benötigte Pharynxmuskulatur. In beiden Geweben wird dabei unter der Kontrolle eines Promotors und Enhancers das Paramyosin-Gen *unc*-15 exprimiert (KAGAWA et al. 1995), welches zusammen mit Myosin die dicken Filamente der Muskulatur bildet (HOPPE u. WATERSTON 2000). In Leitungswasser inkubierte Hypobiose induzierte dritte *D. viviparus*-Larven sind zumeist zusammengerollt und verharren damit bewegungslos. Ebenso zeigen hypobiotische im Gegensatz zu ungehemmten Entwicklungsstadien in der Lunge des Wirtes keine Bewegungsaktivität und nehmen ferner keine Nahrung auf. Diese Aktivitätsunterschiede können als Erklärung für die differentielle Transkription des Paramyosin-Gens herangezogen werden. Unterstützend kommt hinzu, dass beim Southern dot blotting der Klon L3ni 17, welcher Identitäten zu Troponin T- Proteinen verschiedenster Organismen aufwies, unter Verwendung der cDNA-Sonde der L3ni ein deutlich stärkeres Signal als bei der L3i-cDNA-Sonde entstehen ließ. Troponin T bildet zusammen mit den Troponinen C und I einen Komplex, welcher an die aus Aktin und Tropomyosin bestehenden dünnen Filamente

der Muskeln bindet und deren Kontraktion über die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum reguliert (TERAMI et al. 1999).

Die nukleären *anchorage* (*anc*-1) Proteine von *C. elegans* verankern Mitochondrien und den Zellkern in charakteristischer Position an den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und verhindern somit ein freies Umhertreiben im Zytoplasma (HEDGECOCK u. THOMSON 1982; STARR u. HAN 2002). Die ungehemmten dritten *D. viviparus*-Larven, welche eine Länge von 300 bis 400 µm besitzen, entwickeln sich im Wirt innerhalb von drei Wochen zu den 3 bis 8 cm langen Adulten (BACINSKY 1973). Diese intensive Wachstumsphase der L3ni könnte im Zusammenhang mit der Aufregulation der *anc*-1 Gentranskripte stehen, da sie mit vielen Mitosen und somit neu zu verankernden Zellkernen und Mitochondrien einhergeht.

Bei *C. elegans* wird das putative Protein bilateralen Ursprungs insbesondere in den Keimbahnen exprimiert (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_059468.1). Die bei diesem Organismus insgesamt 1416 in den Keimbahnen aufregulierten Gene regulieren beispielsweise die Embryogenese, Meiose, die Entwicklung der Vulva oder die Eiproduktion (REINKE et al. 2000; WALHOUT et al. 2002; PIANO et al. 2002). PIANO et al. (2002) nehmen an, dass diese Gene auch für grundlegende zelluläre und Wachstumsprozesse während der Larvenentwicklung benötigt werden. Somit treibt das homologe *D. viviparus*-Gentranskript vermutlich in den nicht entwicklungsgehemmten Larven die geschlechtliche, möglicherweise auch die allgemeine Entwicklung voran.

Die Funktion des exkretierten/sezernierten sowie des putativen Proteins von *C. elegans* ist bislang noch nicht bekannt. Daher kann kein Zusammenhang zwischen der differentiellen Gentranskription und der nicht inhibierten Entwicklung der *D. viviparus*-Larven hergestellt werden.

5.6.2 L3i-assoziierte Gene

Bei den Hypobiose induzierten Larven konnten aufregulierte Transkripte mit signifikanten Homologien zu Phenylethanolamin-N-Methyltransferasen (L3i 82/101), Guanylyl-Cyclasen (L3i 88), Calmodulinen (L3i 100), Glycerin-Kinasen (L3i 53), DM-DNA-Bindungsdomänen

enthaltenden Proteinen (L3i 99) und einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase A_2 (L3i 75) ermittelt werden.

Wie auch in Vertebraten katalysieren in Nematoden Phenylethanolamin-N-Methyltransferasen (PNMT) die Umsetzung von Phenylethanolamin und Noradrenalin in den Neurotransmitter Adrenalin (KISIEL et al. 1976; FRANDSEN u. BONE 1988; SMART 1988). In Nematoden kommt die PNMT spezifisch in den adrenergen Neuronen des Kopfes vor (WILLETT 1980; GOH u. DAVEY 1985; LEE u. KO 1991). Als Funktion der Catecholamine Noradrenalin und Adrenalin sowie Serotonin wird eine Kontrolle der Bewegung, Entwicklung und Reproduktion sowie der Nahrungsaufnahme und des Kohlenhydratmetabolismus angenommen, die Signalwege sind bislang jedoch nicht geklärt (SMART 1989). Dem Neurotransmitter Noradrenalin wird eine Rolle bei der Häutung der Parasitenstadien zugesprochen (ROGERS u. HEAD 1972; GOH u. DAVEY 1985; FLEMING 1993; BROWNLEE et al. 2000). Ferner ist dieses Catecholamin in die physiologischen Veränderungen involviert, die sich bei der Entwicklung der infektiösen Larve hin zum frühen parasitischen Stadium vollziehen (ROGERS u. HEAD 1972). Diese entwicklungsfördernden Funktionen des Noradrenalins könnten in den Hypobiose induzierten Larven durch dessen gesteigerte Umwandlung in Adrenalin infolge einer erhöhten PNMT-Konzentration reduziert oder unterbunden werden. Dass es sich bei diesem Neurotransmitter um ein spezifisches Produkt der entwicklungsgehemmten Larven handeln könnte, welches in anderen parasitischen Stadien nur eine untergeordnete Rolle spielt, wird durch Untersuchungen von BARGIEL et al. (1970) unterstützt. Diese stellten im Körper von *A. suum* knapp 22 ng Noradrenalin und nur 1,7 ng Adrenalin pro Gramm frischen Gewebes fest. Noch offensichtlicher war dieser Konzentrationsunterschied im Kopfbereich des Nematoden, welcher einen höheren Anteil nervalen Gewebes enthält. Hier fanden die Autoren pro Gramm Gewebe sogar 44 ng Noradrenalin bei unverändertem Adrenalingehalt. Letztgenanntes Catecholamin vermindert bei Nematoden ferner die somatische Aktivität (CROLL 1975), was eine weitere Erklärung für die verstärkte Transkription des PNMT-Homologs in den L3i wäre.

Möglicherweise nimmt das durch die katalytische Aktivität der PNMT synthetisierte Adrenalin sogar eine zentrale Rolle bei der Induktion der Entwicklungshemmung und der damit veränderten Stoffwechsellage der *D. viviparus*-Larven ein. So entdeckten WILLETT et al. (1979)

in dem frei lebenden Erdnematoden *Panagrellus redivivus* eine Catecholamin-sensitive Adenylat-Cyclase, welche den *second messenger* cAMP generiert und dabei stärker von Adrenalin als von Noradrenalin und nur in geringem Maße von Dopamin aktiviert wird (WILLETT u. RAHIM 1978; WILLETT et al. 1979; WILLETT 1980). Die weitere Signaltransduktion wird in Vertebraten über cAMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt (INGEBRITSEN u. COHEN 1983), welche eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellstoffwechsels und der Zelldifferenzierung spielen (EDELMAN et al. 1987) und ferner an der Regulation der Gentranskription beteiligt sind (BERG et al. 2003, S. 973-974).

Über die Aktivierung der Adenylat-Cyclase und dem damit einhergehenden erhöhten cAMP-Spiegel könnte Adrenalin auch in den Energiestoffwechsel der Zellen eingreifen. So nehmen inhibierte *D. viviparus*-Stadien lange Zeit keine Nahrung auf, sondern zehren von ihren Reservegranula. Nach eigenen Beobachtungen erscheinen die sechs bis acht Wochen gekühlten dritten Larven nahezu durchsichtig. Im Gegensatz dazu sind bei frischen dritten Larven sehr viele dunkel gefärbte Granula erkennbar. Bei parasitischen Nematoden repräsentiert Glykogen das primäre Energiespeichermolekül, wohingegen die Energiegewinnung aus Fetten von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (ROBERTS u. FAIRBAIRN 1965; ROGERS u. HEAD 1972; MAGAT et al. 1972). In Vertebraten aktiviert Adrenalin über so genannte 7TM-Rezeptoren die Adenylat-Cyclase, welche ihrerseits über die cAMP-Signalkaskade die Aktivierung der entsprechenden Enzyme für die Utilisation der Fette und des Glykogens bedingt (BERG et al. 2003, S. 642-644 u. 664). Auf Grund der Existenz einer Catecholamin-sensitiven Adenylat-Cyclase in *P. redivivus* (WILLETT et al. 1979) vermutet WILLETT (1980) auch für parasitische Nematoden diesen catecholaminergen Signalweg des Glykogenabbaus. Somit könnte die Adrenalin-vermittelte Signalwirkung das L3i-assoziierte Glycerin-Kinase-Homolog aktivieren und auf diesem Weg die notwendige Energie für das Überleben der inhibierten Stadien bereitstellen. Die zu dem *D. viviparus*-Transkript homologe Glycerin-Kinase von *C. elegans* wird auch in dessen inhibierter *dauer larva* verstärkt transkribiert (WANG u. KIM 2003).

Neben der durch die Adenylat-Cyclase vermittelten Signaltransduktion repräsentiert der Guanylyl-Cyclase-Reaktionsweg ein weiteres wichtiges Signalsystem. Bei *C. elegans* sind bisher 29 verschiedene Guanylyl-Cyclasen (GC) bekannt, deren Rezeptoren in unterschiedlichen

sensorischen Neuronen exprimiert werden (YU et al. 1997). Die zu dem L3i-assoziierten Gentranskript homologen löslichen GCs werden durch das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert (BERG et al. 2003, S. 756) und bilden daraufhin den *second messenger* cGMP. Dieser wiederum aktiviert andere Nukleotid-Cyclasen, cGMP-abhängige Proteinkinasen sowie Phosphodiesterasen oder bindet an cGMP-gesteuerte Ionenkanäle und vermittelt so die intrazelluläre Signalübertragung (BIRNBY et al. 2000; ZUBAY 2000). Die Präsenz einer cGMP-abhängigen Proteinkinase in *A. suum* (THALHOFER u. HOFER 1989) lässt die Existenz eines GC-cGMP-Signalwegs auch in anderen parasitischen Nematoden vermuten. Somit könnte bei *D. viviparus* ein solcher Signalweg maßgeblich in die Induktion der Hypobiose involviert sein. Auch bei *C. elegans* ist eine von *daf*-11 codierte, transmembranale GC (BIRNBY et al. 2000) in die Regulation der Larvenentwicklung involviert. Allerdings wird bei diesem Nematoden die Ausbildung der *dauer larva* durch diese GC unterdrückt (BIRNBY et al. 2000; JONES et al. 2001). Dies muss jedoch nicht zwangsläufig einen Widerspruch in der Regulation der Entwicklungshemmung von *C. elegans* und *D. viviparus* bedeuten, da die Vielfalt der löslichen respektive membrangebundenen GCs auch differente Signaleffekte nach sich zieht.

Das von NO-Synthasen gebildete Signalmolekül NO, welches zur Aktivierung der löslichen GCs benötigt wird (BERG et al. 2003, S. 755-756), findet sich bei *A. suum* im zentralen Nervensystem, dem die sensorischen Organe innervierenden peripheren Nervensystem und dem enterischen Nervensystem (BASCAL et al. 1995; WALKER et al. 1995). Die neuronalen NO-Synthasen von Vertebraten werden erst nach Bindung des Kalzium (Ca^{2+})/Calmodulin-Komplexes katalytisch aktiv (ABU-SOUD et al. 1994; LEE u. STULL 1998) und auch die bislang untersuchten NO-Synthasen von *A. suum* sowie *P. redivivus* sind zumindest partiell von Calmodulin respektive Ca^{2+} abhängig (BOWMAN et al. 1995; BASCAL et al. 2001). Somit könnte zwischen der L3i-assoziierten Gentranskription des Calmodulin-Homologs und des löslichen GC-Homologs ein Zusammenhang bestehen.

Für das Calmodulin-Homolog könnte aber auch eine weiter reichende Rolle im hypobiotischen Prozess der *D. viviparus*-Larven angenommen werden. So stimuliert dieses zur Familie der EF-Hand-Proteine gehörende Regulatorprotein, welches durch Bindung des *second messengers* Ca^{2+} aktiviert wird, eine Reihe von Enzymen, Pumpen und Transportproteinen wie

die Ca^{2+}-ATPase-Pumpe und Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (INGEBRITSEN u. COHEN 1983; BERG et al. 2003, S.447-448). Über letztere moduliert der Ca^{2+}/Calmodulin-Komplex auch die Gentranskription (KAPILOFF et al. 1991), so dass Calmodulin möglicherweise direkt an der Induktion der Hypobiose beteiligt ist. Bezüglich der Aufregulation dieses Transkripts in den L3i bestehen Analogien zu *C. elegans*. Bei diesem Nematoden wird das zum L3i-Transkript homologe sowie ein weiteres Calmodulin ebenfalls in den inhibierten Larven verstärkt transkribiert (http://elegans.bcgsc.bc.ca/SAGE/Dauer_specific_P0.05.txt).

Im Hinblick auf die Regulation der Gentranskription könnte das L3i-Homolog der DM-DNA-Bindungsdomänen enthaltenden Proteine ein Zielpunkt der oben beschriebenen Signalkaskaden sein. Diese *C. elegans*-Homologe sind auch bei diesem Organismus in der inhibierten Larve aufreguliert (http://elegans.bcgsc.bc.ca/SAGE/Dauer_specific_P0.05.txt). Proteine mit DM-Domänen repräsentieren Transkriptionsfaktoren, welche die geschlechtsspezifische Entwicklung einschließlich der Dotterproteinsynthese und der Differenzierung des peripheren Nervensystems regulieren (RAYMOND et al. 1998; YI u. ZARKOWER 1999; YI et al. 2000; LINTS u. EMMONS 2002). Eine solche Funktion ist auch für *D. viviparus* anzunehmen, da diese Gene nach Angabe der Autoren bei Invertebraten und möglicherweise auch Vertebraten evolutionär konserviert sind. Nach den bisherigen Kenntnissen üben Proteine mit DM-DNA-Bindungsdomänen jedoch allein geschlechtsspezifische bzw. -determierende Funktionen aus. Daher erscheint unklar, welche Bedeutung der verstärkten Transkription in den inhibierten *D. viviparus*- und *C. elegans*-Larven bezüglich der Entwicklungshemmung beizumessen ist.

Die Aufregulation des Homologs der Ca^{2+}-unabhängigen Phospholipase A_2 ($iPLA_2$) in den L3i steht möglicherweise in Zusammenhang mit den Inkubationsbedingungen bei der Induktion der Hypobiose. Diese Enzyme remodellieren die membranalen Phospholipide bei gleichzeitiger Inkorporation von Arachidonsäure (BALSINDE et al. 1995; BALSINDE u. DENNIS 1997). Bei Bakterien, Pflanzen und auch höheren Tiere konnte gezeigt werden, dass diese über einen vermehrten Einbau ungesättigter und/oder kurzkettiger Fettsäuren die Schmelztemperatur ihrer Membranen niedrigen Umwelttemperaturen anpassen (VANCE 2000). Dies gewährleistet die Fluidität der Membranlipide, von welcher membranale Prozesse wie die Signaltransduktion und Transportvorgänge abhängen (BERG et al. 2003, S. 368-369). Die aufregulierte Transkription des $iPLA_2$-Homologs wäre somit durch die Inkubation der L3i bei

4 °C erklärbar. Ausgehend von einer verminderten Zellteilungsrate dieser Larven könnte die verstärkte Remodellierung der membranalen Phospholipide an sich als eine weitere Zustandsanpassung betrachtet werden. Die $iPLA_2$ besitzt aber auch die Fähigkeit, Arachidonsäure für die Eikosanoidsynthese freizusetzen (DENNIS 1994). Prostaglandine, Leukotriene und andere Eikosanoide agieren bei Vertebraten als lokale Hormone, die sowohl die Aktivität der Zellen, in welchen sie synthetisiert werden, als auch die der Nachbarzellen verändern, indem sie an 7TM-Rezeptoren binden (BERG et al. 2003, S. 688) und somit beispielsweise die Adenylat-Cyclase aktivieren. Obwohl in einer Vielzahl parasitischer Nematoden verschiedene Eikosanoide nachgewiesen werden konnten, sind diese zwar in Bezug auf Parasit-Wirt-Interaktionen eingehender untersucht, ihre Funktion im parasitischen Organismus selbst ist jedoch weitgehend unbekannt (DAUGSCHIES u. JOACHIM 2000). Somit ist ungewiss, ob und in welcher Weise das $iPLA_2$-Homolog der L3i in die Signalübermittlung eingebunden sein könnte.

Wird die Transkription der PNMT in den adrenergen Kopfneuronen (WILLETT 1980; GOH u. DAVEY 1985; LEE u. KO 1991), der NO-Synthase von *A. suum* im zentralen Nervensystem (BASCAL et al. 1995; WALKER et al. 1995) und der *C. elegans*-GC-Rezeptoren in unterschiedlichen sensorischen Neuronen (YU et al. 1997) auf *D. viviparus* extrapoliert, liegen Anhaltspunkte für eine von den Neuronen des Kopfes ausgehende Signaltransduktion zur Induktion der Hypobiose vor. Dies wäre analog zu *C. elegans*, bei dem Signale chemosensorischer Kopfneuronen die Larvenentwicklung regulieren (BARGMANN u. HORVITZ 1991; VOWELS u. THOMAS 1992; THOMAS et al. 1993; SCHACKWITZ et al. 1996). Da bei *D. viviparus* jedoch niedrige Temperaturen die Induktion der Entwicklungshemmung bedingen, wäre diese Rolle den thermosensorischen Neuronen zuzusprechen. Diese werden bei *C. elegans*, *H. contortus* und *A. caninum* von den ADF-Neuronen repräsentiert (MORI u. OHSHIMA 1995; LI et al. 2000; BHOPALE et al. 2001; LI et al. 2001). Diese Neuronen sind nach Untersuchungen von LI et al. (2001) bei *H. contortus* sehr viel besser im dritten als im ersten Larvenstadium entwickelt. Die Autoren führen hierauf das Verhalten des Parasiten zurück, morgens und abends auf Grashalme zu kriechen, um so von potentiellen Wirten während des Grasens aufgenommen zu werden. Da auch dritte Lungenwurmlarven eine solche Positionierung zeigen, ist wahrscheinlich, dass bei diesem Parasiten die thermosensorischen Neuronen im dritten Larvenstadium ebenfalls gut ausgebildet sind. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit könnte ihre Funktion jedoch weit über diesen verhaltensbezogenen Aspekt hinausgehen.

Bezüglich der aufregulierten Gene der Hypobiose induzierten Larven ist allerdings in Betracht zu ziehen, dass die Aufregulation der entsprechenden Transkripte möglicherweise auch eine Antwort auf einen Energiemangel darstellen könnte. Während die mRNA-Isolierung aus den L3ni spätestens eine Woche nach der Häutung zur dritten Larve erfolgte, verblieben die L3i zur Induktion der Hypobiose für weitere sechs bis acht Wochen ohne Energiezufuhr. Auch CHERKASOVA et al. (2000) messen der mit einem Energiemangel verbundenen Hungerphase der *C. elegans dauer larva* eine gewisse Bedeutung im Hinblick auf deren verstärkte Gentranskription bei. Allerdings stellten die Autoren für alle der von ihnen untersuchten dauer-spezifischen *C. elegans*-Gene ein charakteristisches Transkriptionsmuster während der Zeit der Entwicklungshemmung fest. Während die Transkriptionsraten initial am höchsten waren, fielen diese am dritten Tag moderat ab, um daraufhin konstant zu verbleiben. Daher schlussfolgern CHERKASOVA et al. (2000), dass die Induktion dieser Gene einen Teil des dauer-spezifischen Genprogramms bilden. Sei die Aufregulation nur eine sekundäre Antwort auf die fehlende Energiezufuhr, würde die Transkription dieser Gene nach Meinung der Autoren nicht abfallen und hernach konstant bleiben, sondern mit zunehmender Dauer des Hungerns sogar ansteigen. Um eine Aufregulierung bestimmter Gene als Antwort auf einen Energiemangel sicher auszuschließen, hätten in der vorliegenden Arbeit gekühlte und ungekühlte *D. viviparus*-Larven gleichen Alters verwendet werden müssen. Dies war jedoch nicht zu bewerkstelligen, da die Lebensdauer von bei Raumtemperatur inkubierten dritten Lungenwurmlarven stark begrenzt ist. Letztlich könnten vergleichende Untersuchungen der Gentranskription hypobiotischer und nicht hypobiotischer Stadien im Wirt (L4/L5) die Frage klären, ob die verstärkte Transkription bestimmter L3i-assoziierter Gene ausschließlich auf einem Energiemangel dieser Larvenpopulation beruht.

5.7 Überprüfung der differentiellen Transkription mittels konventioneller PCR

Mit je fünf verschiedenen Templates der L3ni und L3i wurde unter Verwendung der jeweiligen genspezifischen Primerpaare die differentielle Transkription der vervollständigten Gensequenzen überprüft. Die deutlichsten Unterschiede in der Bandenintensität oder gar fehlende Banden in der Driver-cDNA wiesen dabei neben der Sequenz L3i 88 die Sequenzen L3ni 69/92, L3i 82/101 und L3i 99 auf. Daher erscheint es folgerichtig, dass diese Sequenzen

in den subtrahierten cDNA-Banken von jeweils zwei respektive drei (L3i 99/18/86) vollständig oder teilweise identischen Inserts repräsentiert werden.

Diese Untersuchung deutet ferner auf ein differentielles Vorkommen verschiedener Isoformen in den beiden Larvenpopulationen hin. So konnte die entsprechende Bande der L3ni 56d-Isoform regelmäßig unter Verwendung von L3i-cDNA amplifiziert werden, wohingegen dies mit L3ni-cDNA nur in einem Fall gelang. Bei der L3i 75 zeigte sich stets ein vermehrtes Vorliegen der Isoform L3i 75a in der cDNA inhibierter Larven, wohingegen die Isoform L3i 75b nicht konstant Unterschiede in der Bandenintensität bezüglich des L3i- bzw. L3ni-Templates erkennen ließ. Ferner war die Isoform L3i 88a die einzige, welche bei einigen Reaktionen in der L3ni-cDNA nachweisbar war. Jedoch repräsentierte diese Isoform auch immer unter Verwendung der L3i-cDNA die prominenteste Bande. Somit ist wahrscheinlich, dass mit dem L3ni-Template nachweisbare Bande der L3i 88a nicht auf ein differentielles alternatives Spleißen, sondern lediglich auf das in beiden Larvenpopulationen seltenere Vorkommen der übrigen Isoformen zurückzuführen ist.

5.8 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die mit TaqMan™-MGB-Sonden durchgeführte qPCR erbrachte für die Sequenz L3i 82/101 (PNMT) eine signifikante, um mehr als den Faktor 21 erhöhte Kopienzahl dieses Transkriptes in den L3i im Gegensatz L3ni und bestätigte damit die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der differentiellen Transkription dieses Gens. Entgegen der Erwartung ergab die Auswertung der Kopienzahlen der L3ni 69/92 (SOD), wenn auch statistisch nicht signifikant, ebenfalls ein vermehrtes Vorliegen (knapp zweifach erhöht) dieser cDNA in den L3i statt in den L3ni. Dieses Ergebnis ist in sofern widersprüchlich, als dass diese Sequenz, wie auch die L3i 82/101, von zwei Klonen der subtrahierten cDNA-Bank repräsentiert wurde, was als Hinweis auf eine deutliche differentielle Transkription gewertet werden kann. Ebenso zeigte sich dieses Transkript auch bei den übrigen Untersuchungen dieser Arbeit immer als unzweifelhaft differentiell transkribiert. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist eine differentielle Gentranskription des Elongationsfaktors1α, auf welchen die Zielsequenzen normalisiert wurden. Dieses wie auch andere *housekeeping* Gene, beispielsweise β-Aktin oder

die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unterliegen oftmals in verschiedenen Geweben oder Stoffwechselzuständen ebenfalls einer gesteigerten oder verminderten Transkription (BUSTIN 2000; CHERKASOVA et al. 2000; MOE et al. 2001; CHAN et al. 2002; DEINDL et al. 2002; BUSTIN 2002). In der *C. elegans dauer larva* findet sich beispielsweise eine Aufregulation von β-Aktin und EF-1α, wohingegen die Transkriptionsrate dieser zwei *housekeeping* Gene mit zunehmendem Alter des Nematoden abnimmt (CHERKASOVA et al. 2000). Möglicherweise ist diese Abregulation durch eine verminderte Zellteilungsrate sowie einen herabgesetzten Zellstoffwechsel und damit einer allgemeinen Senkung der Gentranskription bedingt. So wird der Elongationsfaktor EF-1α verstärkt in Tumorzellen exprimiert, ferner wird ihm auch eine Funktion bei der Organisation des Zytoskeletts zugesprochen (GRANT et al. 1992; KUANG et al. 1998; CHAN et al. 2002). Daher wäre eine Aufregulation der EF-1α Gensequenz in den stoffwechsel- und zellteilungsaktiveren nicht Hypobiose induzierten Larven denkbar. Läge nur eine zweifach erhöhte Kopienzahl in diesen Larven vor, wäre das vermehrte Vorliegen der L3ni 69/92-Sequenz in den L3i bereits relativiert.

Da die Transkriptionsrate der 18S rRNA im Gegensatz zu den genannten *housekeeping* Genen so gut wie keinen Schwankungen unterliegt, wird sie von verschiedenen Autoren als interner Standard empfohlen (BUSTIN 2000; MOE et al. 2001; DEINDL et al. 2002; BUSTIN 2002). In diesem Fall müsste jedoch Gesamt-RNA als Template in der qPCR eingesetzt werden, da die 18S rRNA bei der mRNA-Isolierung nicht erfasst wird.

Nach den Ergebnissen der Auswertung der verschiedenen Läufe erscheint eine reelle Quantifizierung der Kopienzahlen durch die qPCR eher fraglich. Während bei den einzelnen Duplikaten bezüglich der Ct-Werte maximal Variationskoeffizienten von 5,7 % beobachtet werden konnten, lagen diese bei den Kopienzahlen insgesamt wesentlich höher und reichten bis 87,5 %. Beim Vergleich der Kopienzahlen einer Sequenz ergaben sich zwischen den jeweils fünf verschiedenen L3ni- und L3i-Templates zum Teil auffällige Differenzen, was auf eine unterschiedliche Template-Qualität oder -Quantität zurückgeführt werden könnte. Jedoch waren diese Differenzen auch bei verschiedenen Läufen innerhalb eines der Templates festzustellen, teilweise variierten die Kopienzahlen um den Faktor zehn und mehr. Ebenso stellte WIRTHERLE (2003) eine hohe Variabilität bezüglich der DNA-Quantifizierung fest. Auch in

dieser Untersuchung wurden TaqMan™-MGB-Sonden der Firma APPLIED BIOSYSTEMS, Warrington, UK sowie das Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande) verwendet, ferner erfolgten die Läufe der qPCR im selben Gerät. Diese Variabilität, die mit mangelnder Reproduzierbarkeit der Daten einhergeht, ist dabei von vielfältiger Genese und hat somit eine Aufsummierung der Variabilitäten zur Folge. So sind die mRNA-Isolierung, die reverse Transkription und auch die Amplifikationsreaktionen nicht immer von gleicher Effizienz. Auch spielt neben der durch Pipettierungenauigkeiten differierenden Quantität des Templates, des Plasmids für die Standardreihen, der Primer sowie der Sonde auch die Qualität der genannten Reaktionskomponenten eine wesentliche Rolle. Dabei waren Qualitätsmängel der Primer und im Speziellen der TaqMan™- und TaqMan™-MGB-Sonden ein wiederholtes Problem, insbesondere nach zwei- bis dreimaliger Verwendung eines Aliquots. Nach Meinung von BUSTIN (2002) ist weiterhin dem Quencher Bedeutung beizumessen. So sei beim Einsatz von Sonden mit nicht fluoreszierenden Quenchern, welche auch die TaqMan™-MGB-Sonden dieser Arbeit gebunden waren, im Gegensatz zu fluoreszierenden Quenchern eine weniger gute Spezifität und Reproduzierbarkeit gegeben. Diese vermindert sich weiterhin auf Grund stochastischer Effekte mit sinkender initialer Kopienzahl (PECCOUD u. JACOB 1996), wodurch auch die Ermittlung differentieller Transkriptionsraten erschwert wird (FREEMAN et al. 1999).

Um das Problem der sehr stark variierenden Kopienzahlen zu umgehen, sollte neben der absoluten auch eine auf den jeweiligen Ct-Werten basierende relative Quantifizierung vorgenommen werden. Diese Methode der Quantifizierung erschien insofern als besser geeignet, als dass die Ct-Werte der einzelnen Duplikate nur geringe Standardabweichungen aufwiesen und oftmals auch innerhalb der verschiedenen Läufe eines Templates geringere Variationen aufwiesen als die ermittelten Kopienzahlen. Diese Art der Berechnung konnte jedoch auf Grund ungleicher PCR-Effizienzen des Elongationsfaktors 1α und der jeweiligen Zielsequenz nicht vorgenommen werden.

In Anbetracht der möglichen differentiellen Transkription der Referenzsequenz EF-1α in Verbindung mit der mangelnden Reproduzierbarkeit erscheinen die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR bezüglich einer um den Faktor 21 respektive 2 erhöhten Kopienzahl der L3i 82/101- bzw. L3ni 69/92-Sequenz in den Hypobiose induzierten *Dictyocaulus*-Larven

zweifelhaft. Allerdings könnten die erhaltenen Daten dahingehend interpretiert werden, dass größere Unterschiede in der Transkriptionsrate der L3i 82/101 als der L3ni 69/92 zwischen den beiden Larvenpopulationen bestehen.

5.9 *daf*- und *age*-1 spezifische PCR

Bei dem zur Hypobiose befähigten Erdnematoden *C. elegans* ist bereits eine Vielzahl von Genen bekannt, die den Prozess der Entwicklungshemmung regulieren. Davon ausgehend, dass beim Lungenwurm des Rindes die genetische Regulation der Hypobiose über homologe Proteine erfolgen könnte, wurde genomische *D. viviparus*-DNA auf eventuell vorhandene Genhomologe überprüft. Hierzu kamen insgesamt 35 verschiedene genspezifische Primerpaare für zwölf *daf*-Gene und das *age*-1 Gen, welche bei *C. elegans* in die genetische Steuerung der Hypobiose involviert sind, zum Einsatz. Vier dieser Primerkombinationen verwendete bereits RICKLING (1999) zur Klärung dieser Fragestellung, allerdings wurden die erhaltenen Amplifikate nicht eingehender untersucht.

Mittels der durchgeführten PCRs konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit sämtlichen Primerpaaren Amplifikate erzeugt werden, allerdings trat nur bei Verwendung der *daf*-1 Primerkombination eine singuläre Bande der erwarteten Länge im Agarosegel auf. Ebenso stellte RICKLING (1999) bei Verwendung genomischer DNA adulter Lungenwürmer sowie cDNA von L3ni, L3i und eines nicht zur Hypobiose fähigen Vakzinestammes eine Bande im selben Größenbereich fest. Auch konnte RICKLING (1999) bei Verwendung der Primerkombination *daf*-4 und *age*-1 jeweils eine einzelne Bande der erwarteten Fragmentlänge beobachten, wohingegen die Amplifikation mit dem Primerpaar *daf*-3 misslang. Im Gegensatz dazu entstand in der vorliegenden Arbeit mit diesen drei Primerkombinationen ein multiples Bandenmuster.

RICKLING (1999) spekuliert, dass bei *D. viviparus* bezüglich *daf*-1 und *daf*-4 ähnliche Verhältnissen wie bei *C. elegans* bestehen könnten und sieht des Weiteren Hinweise auf ein Vorliegen des *age*-1 Gens im Genom des Parasiten. Jedoch konnten in der vorliegenden Arbeit mit den insgesamt 83 ermittelten Sequenzen der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR beim Sequenzidentitätsvergleich sowohl auf Nuklein- als auch Aminosäureebene keinerlei Ähnlichkeit mit der *age*-1 respektive den *daf*-Gensequenzen von *C. elegans* festgestellt werden. Da-

her ist zweifelhaft, ob Homologe dieser Gene im Lungenwurmgenom vorliegen. Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass der Einsatz genspezifischer Primer eine weitestgehende Übereinstimmung von eventuell gemeinsam vorliegenden Gensequenzen voraussetzt. Die Verwendung degenerierter Primer hingegen würde auch eine Amplifikation von Sequenzabschnitten mit geringerer Identität erlauben. Da allerdings schon mit den genspezifischen Primerkombinationen fast ausschließlich ein multiples Bandenmuster erzeugt wurde, erscheint diese Vorgehensweise wenig geeignet. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von cDNA statt genomischer DNA als Matrize vermindert werden, da erstere aufgrund fehlender Intronsequenzen eine geringere Komplexität aufweist. Nicht empfehlenswert für eine Untersuchung auf Genhomologe ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit der Einsatz genomischer DNA adulter *D. viviparus*-Exemplare. Bei der Entnahme aus der Lunge verursachen am Nematoden anhaftende Wirtszellen eine Kontamination der zu isolierenden genomischen DNA der Parasiten. So misslang bei der Überprüfung der Sequenzen 16A-u und 12-o mittels genomischer DNA dritter Lungenwurmlarven die Verifizierung dieser beim Einsatz genomischer DNA adulter Stadien erhaltenen Sequenzen. Dies war sowohl mit den genspezifischen *daf*-Primern als auch mit spezifischen Primern für die entsprechenden Insert-Sequenzen der Fall. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Sequenzen 16Au und 12o um Amplifikationsprodukte auf Basis von Wirts-DNA handelt.

Basierend auf den Ergebnissen der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR unterliegt die Regulation der Hypobiose bei *D. viviparus* mit großer Wahrscheinlichkeit anderen Steuerungsmechanismen respektive Signalkaskaden als für *C. elegans* bekannt. Dieser Erdnematode erscheint somit als Modellorganismus für parasitische Nematoden (BURGLIN et al. 1998) bezüglich der genetischen Regulation der Entwicklungshemmung zumindest für *D. viviparus* ungeeignet. Dies wäre durch einen zu geringen Verwandtschaftsgrad parasitischer und frei lebender Nematoden oder parasitenspezifische Signalwege zur genetischen Regulation der Hypobiose erklärbar. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass für eine bestimmte Spezies oder übergeordnete Einheiten jeweils spezifische Gene vorliegen, was bei Datenbankvergleichen offensichtlich wurde. So zeigen ungefähr 50 % der identifizierten *C. elegans*-Gene keine Ähnlichkeit mit anderen Datenbanksequenzen, bei *Brugia* trifft dies auf 55 % der Klone des *expressed sequence tag* (EST)-Projekts zu (BLAXTER et al. 1996). Auch MOORE et al. (2000) konnten bei der Mehrzahl der von ihnen ermittelten 19 *O. ostertagi* cDNA-Sequenzen

keine Identitäten innerhalb der Datenbanken und dabei insbesondere nicht mit *C. elegans* feststellen. Die Autoren werteten die isolierten Gene daher als spezifisch für parasitische Nematoden. Ähnliche Verhältnisse liegen bei den eigenen Untersuchungen vor. Von den insgesamt 209 sequenzierten Inserts der subtrahierten cDNA-Banken zeigten lediglich 20 Klone auf Aminosäureebene als signifikant gewertete Übereinstimmungen mit den Datenbanksequenzen, wobei sich die Identitäten auf 16 verschiedene Proteinen bezogen. Auf Nukleinsäureebene konnten nur für sechs Klone signifikante Identitäten ermittelt werden.

Bezüglich der genetischen Regulation der Larvenentwicklung scheinen jedoch auch übereinstimmende Mechanismen bei dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* und parasitischen Nematoden vorzuliegen. So zeigen vergleichende Untersuchungen von *A. caninum* und *C. elegans*, dass die Aufhebung der Entwicklungshemmung wahrscheinlich über die gleichen Signale vermittelt respektive inhibiert wird (TISSENBAUM et al. 2000, ARASU 2001). HAWDON u. DATU (2003) sehen auf Grund ihrer Untersuchungen in der genetischen Regulation des dauer *recovery* von *C. elegans* ein Modell für die Parasiteninfektion des Wirtes. Inwieweit molekularbiologische Untersuchungen parasitärer DNA auf *C. elegans*-Genhomologe den von EYSKER (1997) erhofften Erkenntnisgewinn über die inhibierte und nicht inhibierte Entwicklung dritter parasitischer Nematodenlarven vorantreiben könnte, bleibt somit abzuwarten.

5.10 Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Es konnte belegt werden, dass bei dem verwendeten Stamm des bovinen Lungenwurms die Entwicklungsinhibition experimentell durch Kühlung infektiöser dritten Larven induzierbar ist. Daher konnten Untersuchungen zur differentiellen Gentranskription in Hypobiose induzierten und nicht induzierten Stadien mit der Technik der Suppression Subtractive Hybridization, gefolgt von der Erstellung subtrahierter cDNA-Banken, vorgenommen werden. Mittels Differential Screening und Southern dot blotting wurden insgesamt 48 Insert-Sequenzen der cDNA-Banken als differentiell transkribiert verifiziert. Der Erstellung vollständiger cDNA-Sequenzen und auch Transkriptvarianten gelang mit Hilfe der Rapid Amplification of cDNA Ends und *spliced leader* 1 (SL1)-spezifischen PCR bei 16 von 19 nach einem Sequenzidenti-

tätsvergleich ausgewählten Gensequenzen. Bei diesem wie auch dem zweiten Sequenzidentitätsvergleich konnten signifikante Übereinstimmungen mit Genen bzw. Proteinen festgestellt werden, welche der Signalregistrierung und -transduktion sowie der Genregulation, Zellteilung oder Zelldifferenzierung dienen. Auch ergaben sich Übereinstimmungen mit Proteinen, die metabolische sowie lokomotorische Funktionen erfüllen oder in Parasit-Wirt-Interaktionen involviert sind. Die quantitative real-time PCR bestätigte zusätzlich die differentielle Transkription einer der zwei untersuchten Gensequenzen.

Die Existenz der SL1-Sequenz konnte auch für *D. viviparus* gezeigt werden. Homologe verschiedener *daf*-Gene sowie des *age*-1 Gens des Erdnematoden *C. elegans* konnten bei *D. viviparus* nicht festgestellt werden.

Die ermittelten differentiell transkribierten Sequenzen sowie die erstellten, hypothetischen Signalwege bedürfen noch weiterführender Untersuchungen zur Bestätigung ihrer Rolle bei der genetischen Regulation der Larvenentwicklung. Dies könnte durch vergleichende Untersuchungen zur Gentranskription hypobiotischer und nicht hypobiotischer im Wirt befindlichen vierten und fünften Lungenwurmstadien erfolgen. Die Ausschaltung der ermittelten differentiell transkribierten Gene oder der entsprechenden Transkripte mit nachfolgenden Infektionsversuchen könnte letztlich die genetische Regulation der Hypobiose durch diese Gene bestätigen. Durch die Identifikation spezifischer Gene gehemmter Larven ist die Herstellung einer Vakzine möglich, welche den Wirt in die Lage versetzt, auch hypobiotische Stadien durch Immunmechanismen zu eliminieren. Ebenso könnten die erhaltenen differentiell transkribierten Gene als Grundlage für Untersuchungen hinsichtlich der genetischen Steuerungsmechanismen der Hypobiose in anderen parasitischen Nematoden dienen.

6 Zusammenfassung

Christina Strube (2004):

Differentielle Gentranskription bei Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten Larven von *Dictyocaulus viviparus*

Die Diktyokaulose ist eine der bedeutsamsten parasitären Erkrankungen der Weiderinder. Dabei sind unerkannt mit hypobiotischen Lungenwurmstadien infizierte Tiere bezüglich der Verbreitung der Parasitenpopulation von Jahr zu Jahr von besonderer epidemiologischer Bedeutung. Davon ausgehend, dass die Entwicklungshemmung nach der Induktion durch Außenfaktoren einer genetischen Regulation unterliegt, wurde die Gentranskription von Hypobiose induzierten und nicht induzierten dritten *D. viviparus*-Larven vergleichend untersucht. Zur Untersuchung der differentiellen Gentranskription bei Hypobiose induzierten und nicht induzierten Drittlarven erfolgte unter Anwendung der Suppression Subtractive Hybridization eine Anreicherung der differentiellen Transkripte zur Erstellung subtrahierter cDNA-Banken. Diese enthielten 105 Klone der Hypobiose induzierten und 104 Klone der nicht induzierten Lungenwurmlarven. Nach der Überprüfung der cDNA-Banken mit der Technik des Differential Screenings verblieben 58 Klone der Hypobiose induzierten und 44 Klone der nicht induzierten Stadien, von denen 26 respektive 22 Klone mittels Southern dot blotting verifiziert werden konnten. Von den insgesamt 48 Genfragmenten zeigten 20 Transkripte signifikante Homologien mit 16 verschiedenen Nuklein- bzw. Proteinsequenzen. Unter Anwendung der Rapid Amplification of cDNA Ends und einer *spliced leader* 1 (SL1)-spezifischen PCR wurden 16 der differentiellen Gensequenzen sowohl in 3´- als auch in 5´-Richtung komplettiert. Im Zuge dieser Vervollständigung ergaben sich für neun verschiedene Gensequenzen Transkriptvarianten. Ein erneuter Sequenzidentitätsvergleich erbrachte bezüglich der nicht induzierten Larven aussagekräftige Übereinstimmungen mit extrazellulären Kupfer-Zink-Superoxiddismutasen (SOD), Paramyosinen, nukleären *anchorage* Proteinen, dem Vorläufer eines exkretierten/sezernierten Proteins, einem putativen Protein bilateralen Ursprungs und einem weiteren putativen Protein. Diese Identitäten bezogen sich auf Sequenzen von *C. elegans*, mitunter auch auf parasitische Nematoden und andere Invertebraten als auch auf Vertebraten. Bei den Hypobiose induzierten *Dictyocaulus*-Larven konnten signifikante Homolo-

gien mit Phenylethanolamin-N-Methyltransferasen (PNMT), Guanylyl-Cyclasen, Calmodulinen, Glycerin-Kinasen, DM-DNA-Bindungsdomänen enthaltenden Proteinen und einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase A_2 der oben angeführten Organismen festgestellt werden. Diese Proteine, welche funktional an der Signalregistrierung und -transduktion, der Zellteilung und -differenzierung, der Regulation der Transkription, dem Metabolismus und der Lokomotion beteiligt oder in Parasit-Wirt-Interaktionen involviert sind, können in fast allen Fällen mit der inhibierten respektive nicht inhibierten Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden. Mit dem PNMT- und dem SOD-Homolog wurde zur Bestimmung der Transkriptionsrate in den Hypobiose induzierten und nicht induzierten Larven eine quantitative real-time PCR vorgenommen. Bei dem PNMT-Homolog ergaben sich signifikante Unterschiede der in den beiden Larvenpopulationen vorliegenden Kopienzahlen, wodurch die differentielle Transkription auch mit dieser Methode bestätigt werden konnte. Um der Frage nachzugehen, ob bei *D. viviparus* Genhomologe der so genannten *dauer formation* (*daf)*-Gene und des *age*-1 Gens, welche bei dem frei lebenden Erdnematoden *C. elegans* die larvale Entwicklung regulieren, vorhanden sind, wurden von zwölf dieser Gene insgesamt 35 spezifische Primerpaare ausgewählt. Die Klonierung und Sequenzierung von 83 Amplifikationsprodukten ergab jedoch keinen Hinweis auf das Vorhandensein solcher Gene bei *D. viviparus*, für dessen mRNA jedoch die Existenz der SL1-Sequenz nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben erste Einblicke in die genetischen Steuerungsmechanismen der inhibierten und nicht inhibierten Larvenentwicklung des bovinen Lungenwurms.

7 Summary

Christina Strube (2004):

Differential gene transcription of hypobiosis induced and not induced third-stage larvae of *Dictyocaulus viviparus*.

Dictyocaulosis is one of the most important parasitic diseases in first-year grazing calves. Cattle infected with hypobiotic larvae play an important epidemiological part as silent carriers, ensuring parasite survival from year to year. Assuming that inhibition of development of *D. viviparus* induced by external factors is genetically regulated, the gene transcription of hypobiosis induced and not induced third-stage larvae was compared. To investigate differential gene transcription of hypobiosis induced and not induced larvae Suppression Subtractive Hybridization was used to enrich differentially transcribed gene fragments for creating subtracted libraries, containing 105 clones of the inhibited and 104 clones of the not inhibited larvae. After Differential Screening, 54 clones of the hypobiosis induced and 44 clones of the not induced stages were remaining as differential sequences. From these, 26 and 22 clones could be verified by Southern dot blotting, respectively. Of the in all 48 gene transcripts 20 transcripts showed significant homologies with 16 different nucleotide and protein sequences, respectively. By performing Rapid Amplification of cDNA Ends and a spliced leader 1 (SL1) specific PCR, the full length of 16 sequences for the 3´- as well as the 5´-end was obtained, thereby observing transcript variants of nine gene sequences. Renewed search for sequence identities to the transcripts of the not induced larvae resulted in significant homologies to extracellular cooper/zinc superoxide dismutases (SOD), paramyosins, nuclear anchorage proteins, a secreted/excreted protein precursor, a putative protein of bilateral origin and another putative protein. These identities were found to sequences of *C. elegans*, now and then also of parasitic nematodes, other invertebrates as well as of vertebrates. In the hypobiosis induced larvae, there were significant similarities to phenylethanolamine-N-methyltransferases (PNMT), guanylyl cyclases, calmodulins, glycerol kinases, DM DNA binding containing proteins and a calcium-independent phospholipase A_2 of the organisms listed above. These proteins are functionally involved in signal registration and transduction, cell division and differentiation, the regulation of transcription, metabolism and locomotion or take part in parasite-

host-interactions. In almost all cases these proteins could be connected with arrested and not arrested development, respectively. To investigate the transcription levels of the SOD homologue and the PNMT homologue in the hypobiosis induced and not induced *Dictyocaulus*-larvae, quantitative real-time PCR was performed. For the PNMT homologue, this method showed significant differences with reference to the copy numbers in the two larval populations, confirming differential gene transcription. To investigate, if there are homologues of the so called *dauer formation* (*daf)* genes and the *age*-1 gene of the free living soil nematode *C. elegans* existing in *D. viviparus*, in all 35 primer pairs of 12 of these genes were designed. By cloning and sequencing of 83 amplification products there was no indication of such genes in *D. viviparus*.

By the results of this project there is a first insight to the genetic regulation of inhibited and not inhibited larval development of the bovine lungworm.

8 Literaturverzeichnis

ABU-SOUD, H. M., L. L. YOHO u. D. J. STUEHR (1994):
Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism
J. Biol. Chem. 269, 32047-32050

AFONINA, I., I. KUTYAVIN, E. LUKHTANOV, R. B. MEYER u. H. GAMPER (1996):
Sequence-specific arrest of primer extension on single-stranded DNA by an oligonucleotide-minor groove binder conjugate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3199-3204

AIELLO, L. P., G. S. ROBERTSON, Y. LIN, Y. NISHIO u. G. L. KING (1994):
Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6231-6235

ALBERT, P. S., S. J. BROWN u. D. L. RIDDLE (1981):
Sensory control of *dauer larva* formation in *Caenorhabditis elegans*
J. Comp. Neurol. 198, 435-451

ALBERT, P. S. u. D. L. RIDDLE (1983):
Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans dauer larva*
J. Comp. Neurol. 219, 461-481

ALBERT, P. S. u. D. L. RIDDLE (1988):
Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae
Dev. Biol 126, 270-293

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS u. D. J. LIPMAN (1990):
Basic local alignment search tool
J. Mol. Biol. 215, 403-410

ANDERSON, N. (1977):
The efficiency of levamisole, thiabendazole and fenbenadazole against naturally acquired infections of *Ostertagia ostertagi* in cattle
Res. Vet. Sci. 23, 298-302

ANDERSON, N. (1988):
Control of *Ostertagia ostertagi* infections in Australia
Vet. Parasitol. 27, 49-57

ANDERSON, N., J. ARMOUR, W. F. H. JARRETT, J. JENNINGS, J. D. RITCHIE u. G. M. URQUARD (1965a):
A field study of parasitic gastritis in cattle
Vet. Rec.77, 1196-1204

ANDERSON, N., J. ARMOUR, J. JENNINGS, J. D. RITCHIE u. G. M. URQUARD (1965b):
Inhibited development of *Ostertagia ostertagi*
Vet. Rec.77, 146-147

ANDREWS, S. J. (2000):
The efficacy of levamisole, and a mixture of oxfendazole and levamisole, against the arrested stages of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep
Vet. Parasitol. 88, 139-146

ANTEBI, A., J. G. CULOTTI u. E. M. HEDGECOCK (1998):
daf-12 regulates developmental age and the dauer alternative in *Caenorhabditis elegans*
Development 125, 1191-1205

ANTEBI, A., W. H. YEH, D. TAIT, E. M. HEDGECOCK u. D. L. RIDDLE (2000):
daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*
Genes Dev. 14, 1512-1527

APFELD, J. u. C. KENYON (1998):
Cell nonautonomy of *C. elegans daf*-2 function in the regulation of diapause and life span
Cell 95, 199-210

ARASU, P. (2001):
In vitro reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor-beta
J. Parasitol. 87, 733-738

ARMOUR, J. (1978):
Arrested development in cattle nematodes with special reference to *Ostertagia ostertagi*
in: F. H. M. BORGSTEEDE, J. ARMOUR, u. J. JANSEN (Hrsg.): Facts and Reflections III
Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande, S.77-88

ARMOUR, J. u. R. G. BRUCE (1974):
Inhibited development in *Ostertagia ostertagi* infections - a diapause phenomenon in a nematode
Parasitology 69, 161-174

ARMOUR, J. u. M. DUNCAN (1987):
Arrested larval development in cattle nematodes
Parasitology Today 3, 171-176

ARMOUR, J., F. W. JENNINGS u. G. M. URQUART (1967):
The possible existence of two strains of *Ostertagia ostertagi*
Vet. Rec.80, 208-209

ARMOUR, J., F. W. JENNINGS u. G. M. URQUHART (1969):
Inhibition of *Ostertagia ostertagi* at the early fourth larval stage - I. The seasonal incidence
Res. Vet. Sci.10, 232-237

BACINSKY, A. (1973):
[The morphological evaluation of *Dictyocaulus viviparus* found in red deer and cattle]
Morfologicke zhodnotenie povodcov diktyokaulozy ziskanych z jelenov a z hovädzieho dobytka
Folia Veterinaria 17, 209-219

BAERMANN, G. (1917):
Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum*-(Nematoden)-Larven in Erdproben
Tijdschr.Diergeneeskd. 57, 131-137

BAIN, R. K. u. W. SYMINGTON (1986):
ELISA in lungworm infection
Vet. Rec. 118, 252

BALSINDE, J., I. D. BIANCO, E. J. ACKERMANN, K. CONDE-FRIEBOES u. E. A. DENNIS (1995):
Inhibition of calcium-independent phopholipase A_2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in $P388D_1$ macrophages
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 8527-8531

BALSINDE, J. u. E. A. DENNIS (1997):
Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2
J. Biol. Chem. 272, 16069-16072

BARGIEL, Z., E. WASILEWSKA u. B. A. SHISOV (1970):
Adrenaline (A) and noradrenalin (NA) in tissue of *Ascaris suum* Goeze, 1782 (Nematoda)
Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 18, 287-288

BARGMANN, C. I. u. H. R. HORVITZ (1991):
Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*
Science 251, 1243-1246

BARTH, D. u. J. M. PRESTON (1987):
Treatment of inhibited *Dictyocaulus viviparus* in cattle with ivermectin
Vet. Parasitol. 25, 61-66

BASCAL, Z., J. M. CUNNINGHAM, L. HOLDEN-DYE, M. O´SHEA u. R. J. WALKER (2001):
Characterization of a putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasitic nematode *Ascaris suum*
Parasitology 122, 219-231

BASCAL, Z., A. MONTGOMERY, L. HOLDEN-DYE, R. G. WILLIAMS u. R. J. WALKER (1995):
Histochemical mapping of NADPH diaphorase in the nervous system of the parasitic nematode *Ascaris suum*
Parasitology 110, 625-637

BAUER, C., T. STEINBACH, C. HERMOSILLA, I. M. DAMRIYASA, H. H. L. SASSE u. H. ZAHNER (2003):
Anthelmintische Metaphylaxe in Pferdegruppen mit larvaler Cyathostominose: Auslöser klinischer Erkrankungen?
in: Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und Parasitäre Krankheiten", Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen, Leipzig (Abstract) S. 50

BAUER, D., H. MULLER, J. REICH, H. RIEDEL, V. AHRENKIEL, P. WARTHOE u. M. STRAUSS (1993):
Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR)
Nucleic Acids Res. 21, 4272-4280

BECK, M. T., L. HOLLE u. W. Y. CHEN (2001):
Combination of PCR subtraction and cDNA microarray for differential gene expression profiling
Biotechniques 31, 782-4, 786

BELLMER, A. (1990):
Seroepidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von *Dictyocaulus*-Infektionen bei Rindern in Niedersachsen mit Hilfe des ELISA
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BERG, J. M., J. L. TYMOCZKO u. L. STRYER (2003):
Biochemie
5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg u. Berlin, S. 368-369, 447-448, 642-644, 664, 688, 755-756, 793-794

BERTIOLI, D. J., U. H. A. SCHLICHTER, M. J. ADAMS, P. R. BURROWS, H. H. STEINBIß u. J. F. ANTONIW (1995):
An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs
Nucleic Acids Res. 23, 4520-4523

BHOPALE, V. M., E. K. KUPPRION, F. T. ASHTON, R. BOSTON u. G. A. SCHAD (2001):
Ancylostoma caninum: the finger cell neurons mediate thermotactic behavior by infective larvae of the dog hookworm
Exp. Parasitol. 97, 70-76

BIENIOSCHEK, S. (1994):
Experimentelle Wechselinfektionen zwischen Zerviden und Hauswiederkäuern mit großen Lungenwürmern (*Dictyocaulus spp.)*.
Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

BIRNBY, D. A., E. M. LINK, J. J. VOWELS, H. TIAN, P. L. COLACURCIO u. J. H. THOMAS (2000):
A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 155, 85-104

BISSET, S. A. u. E. D. MARSHALL (1987):
Dynamics of *Ostertagia* spp. and *Cooperia oncophora* in field-grazed cattle from weaning to 2 years old in New Zealand, with particular reference to arrested development
Vet. Parasitol. 24, 103-116

BLAXTER, M. u. L. LIU (1996):
Nematode spliced leaders - ubiquity, evolution and utility
Int. J. Parasitol. 26, 1025-1033

BLAXTER, M. L., N. RAGHAVAN, I. GOSH, D. GUILIANO, W. LU, S. A. WILLIAMS, B. SLATKO u. A. L. SCOTT (1996):
Genes expressed in *Brugia malayi* infective third stage larvae
Mol. Biochem. Parasitol. 77, 77-93

BLITZ, N. M. u. H. C. GIBBS (1972a):
Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep - I. The induction of arrested development
Int. J. Parasitol. 2, 5-12

BLITZ, N. M. u. H. C. GIBBS (1972b):
Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep - II. Termination of arrested development and the spring rise phenomenon
Int. J. Parasitol. 2, 13-22

BLOCH, U. E. (1782):
Abhandlung von der Erzeugung der Eingeweidewürmer und den Mitteln wider derselben
Berlin

BOKHOUT, B. A., J. H. BOON u. J. HENDRICKS (1979):
Operational diagnostics of lungworm infection in cattle
Vet. Quart. 1, 195-203

BOON, J. H., A. KLOOSTERMAN u. M. BREUKINK (1984):
Parasitological, serological and clinical effects of continuous graded levels of *Dictyocaulus viviparus* inoculations in calves
Vet. Parasitol. 16, 261-272

BOON, J. H., A. KLOOSTERMAN u. R. van DEN BRINK (1982):
The incidence of *Dictyocaulus viviparus* infections in the Netherlands - I. The enzyme linked immunosorbent assay as a diagnostic tool
Vet. Quart. 4, 155-160

BOON, J. H., H. W. PLOEGER u. A. J. RAAYMAKERS (1986):
Sero-epidemiological survey of *Dictyocaulus viviparus* infections in first-season grazing calves in The Netherlands
Vet. Rec. 119, 475-479

BORGSTEEDE, F. H. u. M. EYSKER (1987):
Strains of cattle parasites in the Netherlands with different propensities for inhibited development
Vet. Parasitol. 24, 93-101

BOS, H. J. u. J. BEEKMAN (1985):
Serodiagnosis of lungworm infection in calves using ELISA
Develop. Biol. Standard 62, 45-52

BOWMAN, J. W., C. A. WINTERROWD, A. R. FRIEDMAN, D. P. THOMPSON, R. D. KLEIN, J. P. DAVIS, A. G. MAULE, K. L. BLAIR u. T. G. GEARY (1995):
Nitric oxide mediates the inhibitory effects of SDPNFLRFamide, a nematode FMRFamide-related neuropeptide, in *Ascaris suum*
Journal of Neurophysiology 74, 1880-1888

BREITENBACH, U., J. P. TUCKERMANN, C. GEBHARDT, K. H. RICHTER, G. FÜRSTENBERGER, G. CHRISTOFORI u. P. ANGEL (2001):
Keratinocyte-specific onset of serine protease BSSP expression in experimental carcinogenesis
The Journal of Investigate Dermatology 117, 634-640

BRENNER, S. (1974):
The genetics of *Caenorhabditis elegans*
Genetics 77, 71-94

BROPHY, P. M., L. H. PATTERSON u. D. L. PRITCHARD (1995):
Secretory nematode SOD - offensive or defensive?
Int. J. Parasitol. 25, 865-866

BROWNLEE, D., L. HOLDEN-DYE u. R. WALKER (2000):
The range and biological activity of FMRFamide-related peptides and classical neurotransmitters in nematodes
Adv. Parasitol. 45, 109-180

BÜRGER, H. J. (1983):
Pathogenese, Epizootiologie und Bekämpfungsmöglichkeiten von Rundwurmerkrankungen beim Rind
Prakt. Tierarzt 64, 3-10

BÜRGER, H. J. (1987):
Prophylaxe und Therapie parasitärer Krankheiten bei Wiederkäuern
in: 17. Kongress DVG, Bad Nauheim, S.106-125

BURGLIN, T. R., E. LOBOS u. M. L. BLAXTER (1998):
Caenorhabditis elegans as a model for parasitic nematodes
Int. J. Parasitol. 28, 395-411

BUSTIN, S. A. (2000):
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays
J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193

BUSTIN, S. A. (2002):
Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems
J. Mol. Endocrinol. 29, 23-39

CAHILL, C. M., G. TZIVION, N. NASRIN, S. OGG, J. DORE, G. RUVKUN u.
M. ALEXANDER-BRIDGES (2001):
Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways
J. Biol. Chem. 276, 13402-13410

CALLAHAN, H. L., R. K. CROUCH u. E. R. JAMES (1990):
Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for *Onchocerca cervicali* microfilariae
Parasitology 100, 407-415

CAPITINI, L. A., K. E. McCLURE u. R. P. HERD (1990):
Effect of environmental stimuli on pre-infective and infective stages of *Haemonchus contortus* in the northern United States for the induction of hypobiosis
Vet. Parasitol. 35, 281-293

CASSADA, R. C. u. R. L. RUSSELL (1975):
The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*
Dev. Biol. 46, 326-342

CHAN, E. C., S. FRASER, S. YIN, G. YEO, K. KWEK, R. J. FAIRCLOUGH u. R. SMITH (2002):
Human myometrial genes are differentially expressed in labor: a suppression subtractive hybridization study
J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 2435-2441

CHERKASOVA, V., S. AYYADEVARA, N. EGILMEZ u. R. R. SHMOOKLER (2000):
Diverse *Caenorhabditis elegans* genes that are upregulated in *dauer larva*e also show elevated transcript levels in long-lived, aged, or starved adults
J. Mol. Biol. 300, 433-448

CHIEJINA, S. N., B. B. FAKAE u. B. O. EZE (1988):
Arrested development of gastrointestinal trichostrongylids in goats in Nigeria
Vet. Parasitol. 28, 103-113

CHRISTENSEN, C. M., P. NANSEN, S. A. HENRIKSEN, J. MONRAD u. F. SATRIJA (1992):
Attempts to immunize cattle against *Ostertagia ostertagi* infections employing 'normal' and 'chilled' (hypobiosis-prone) third stage larvae
Vet. Parasitol. 44, 247-261

COBURN, C. M., I. MORI, Y. OHSHIMA u. C. I. BARGMANN (1998):
A cyclic nucleotide-gated channel inhibits sensory axon outgrowth in larval and adult *Caenorhabditis elegans*: a distinct pathway for maintenance of sensory axon structure
Development 125, 249-258

COLLIE, D. D., C. N. MACALDOWIE, A. D. PEMBERTON, C. J. WOODALL, N. McLEAN, C. HODGSON, M. W. KENNEDY u. H. R. MILLER (2001):
Local lung responses following local lung challenge with recombinant lungworm antigen in systemically sensitized sheep
Clin. Exp. Allergy 31, 1636-1647

CONNAN, R. M. (1969):
Studies on the inhibited development of *Ostertagia spp*. in lambs
J. Helminthol. 42, 9-28

CONNAN, R. M. (1975):
The seasonal incidence of inhibition of development in *Haemonchus contortus*
Res. Vet. Sci. 12, 272-274

CONNAN, R. M. (1978):
Arrested development in *Haemonchus contortus*
in: F. H. M. BORGSTEEDE, J. ARMOUR, u. J. JANSEN (Hrsg.): Facts and Reflections III
Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande S.53-62

CONNAN, R. M. (1993):
Calfhood vaccination for dictyocaulosis
Vet. Rec. 133, 554-555

CORNWELL, R. L. (1960):
The complement fixing antibody response of calves to *Dictyocaulus viviparus*
J. Comp. Path. 70, 499-513

CRAMER, L. G., S. R. PITT, S. REHBEIN, R. P. GOGOLEWSKI, B. N. KUNKLE, W. K. LANGHOFF, K. G. BOND u. A. E. MACIEL (2000):
Persistent efficacy of topical eprinomectin against nematode parasites in cattle
Parasitol. Res. 86, 944-946

CROLL, N. A. (1975):
Indolealkylamines in the coordination of nematode behavioural activities
Can. J. Zool. 53, 15-19

DALLEY, B. K. u. M. GOLOMB (1992):
Gene expression in the *Caenorhabditis elegans dauer larva*: developmental regulation of Hsp90 and other genes
Dev. Biol. 151, 80-90

DAME, J. B., M. S. BLOUIN u. C. H. COURTNEY (1993):
Genetic structure of populations of *Ostertagia ostertagi*
Vet. Parasitol. 46, 55-62

DAS, M., I. HARVEY, L. L. CHU, M. SINHA u. J. PELLETIER (2001):
Full-lenght cDNAs: more than just reaching the ends
Physiol. Genomics 6, 57-80

DAUGSCHIES, A. u. A. JOACHIM (2000):
Eicosanoids in parasites and parasitic infections
Adv. Parasitol. 46, 181-240

DAVID, G. P. (1993):
Increased prevalence of husk
Vet. Rec.113, 627-628

DE LEEUW, W. A. u. J. B. CORNELISSEN (1991):
Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*
Vet. Parasitol. 39, 137-147

DEINDL, E., K. BOENGLER, N. van ROYEN u. W. SCHAPER (2002):
Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries
Mol. Cell. Biochem. 236, 139-146

DENNIS, E. A. (1994):
Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A_2
J. Biol. Chem. 269, 13057-13060

DIATCHENKO, L., Y. F. LAU, A. P. CAMPBELL, A. CHENCHIK, F. MOQADAM, B. HUANG, S. LUKYANOV, K. LUKYANOV, N. G. GURSKAYA, E. D. SVERDLOV u. P. D. SIEBERT (1996):
Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6025-6030

DIATCHENKO, L., S. LUKYANOV, Y. F. LAU u. P. D. SIEBERT (1999):
Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes
Methods Enzymol. 303, 349-380

DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER u. J. S. MATTICK (1991):
'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification
Nucleic Acids Res. 19, 4008

DONCASTER, C. C. (1981):
Observations on relationships between infective juveniles of bovine lungworm, *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda: Strongylida) and the fungi, *Pilobolus kleinii* and *P. crystallinus* (Zygomycotina: Zygomycetes)
Parasitology 82, 421-428

DOPCHIZ, M. C., A. E. PARMA u. C. A. FIEL (2000):
Hypobiosis induction alters the protein profile of *Ostertagia ostertagi* (Nematoda: *Trichostrongylidae*)
Folia Parasitol. (Praha) 47, 135-140

DUNSMORE, J. D. (1960):
Retarted development of *Ostertagia species* in sheep
Nature 186, 986-987

DÜWEL, D. (1971):
Die Dictyocaulose des Rindes
Tierärztl. Umschau 26, 152-158

ECKERT, J. (1972):
Bekämpfung der Dictyocaulose und der Trichostrongylidosen des Rindes
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 114, 652-667

EDELMAN, A. M., D. K. BLUMENTHAL u. E. G. KREBS (1987):
Protein serine/threonine kinases
Annu. Rev. Biochem. 56, 567-613

ENIGK, K. u. D. DÜWEL (1962):
Beitrag zur Epizootiologie der Dictyocaulose des Rindes
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 72-78

ENIGK, K. u. J. HILDEBRANDT (1969):
Zur Empfänglichkeit der Wiederkäuer für *Dictyocaulus viviparus* und *Dictyocaulus filaria* (*Strongyloidea*, *Nematoda*)
Zentralbl. Veterinärmed. [B] 16, 77

ENTROCASSO, C. M. (1988):
Epidemiology and control of bovine ostertagiasis in South America
Vet. Parasitol. 27, 59-65

EPE, C., S. BIENIOSCHEK, S. REHBEIN u. T. SCHNIEDER (1995):
Comparative RAPD-PCR analysis of lungworms (*Dictyocaulidae*) from fallow deer, cattle, sheep, and horses
Zentralbl. Veterinärmed. [B] 42, 187-191

EPE, C., G. v. SAMSON-HIMMELSTJERNA u. T. SCHNIEDER (1997):
Differences in a ribosomal DNA sequence of lungworm species (Nematoda: *Dictyocaulidae*) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys
Res. Vet. Sci. 62, 17-21

EPE, C., WOIDTKE S., M. PAPE, M. HEISE, F. KRAEMER, C. KOHLMETZ u. T. SCHNIEDER (1999):
Strategic control of gastrointestinal nematode and lungworm infections with eprinomectin at tournout and eight weeks later
Vet. Rec. 144, 380-382

ERMOLAEVA, O. D. u. E. D. SVERDLOV (1996):
Subtractive hybridization, a technique for extraction of DNA sequences distinguishing two closely related genomes: critical analysis
Genet. Anal. 13, 49-58

ESTEVEZ, M., L. ATTISANO, J. L. WRANA, P. S. ALBERT, J. MASSAGUE u. D. L. RIDDLE (1993):
The *daf*-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans dauer larva* development
Nature 365, 644-649

EYSKER, M. (1978):
The significance of inhibited development on the epidemiology of trichostrongylid infections in sheep in The Netherlands
in: F. H. M. BORGSTEEDE, J. ARMOUR, u. J. JANSEN (Hrsg.): Facts and Reflections III
Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande S.25-42

EYSKER, M. (1981a):
Experiments on inhibited development of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in The Netherlands
Res. Vet. Sci. 30, 62-65

EYSKER, M. (1981b):
Resistance to reinfection with *Haemonchus contortus* in lactating and barren ewes following a single infection with larvae conditioned for inhibited development
Z. Parasitenkd. 65, 343-351

EYSKER, M. (1993):
The role of inhibited development in the epidemiology of *Ostertagia* infections
Vet. Parasitol. 46, 259-269

EYSKER, M. (1997):
Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants
Vet. Parasitol. 72, 265-272

EYSKER, M., J. H. BOERSEMA, J. B. CORNELISSEN, F. N. KOOYMAN u. W. A. DE LEEUW (1992):
Dictyocaulus viviparus in calves: effect of rotational grazing on the development of infections
Vet. Parasitol. 41, 127-135

EYSKER, M., J. H. BOERSEMA u. W. M. HENDRIKX (1990):
Recovery of different stages of *Dictyocaulus viviparus* from cattle lungs by a combination of a perfusion and a Baermann technique
Res. Vet. Sci. 49, 373-374

EYSKER, M., E. W. CLAESSENS, T. J. LAM, M. J. MOONS u. A. PIJPERS (1994):
The prevalence of patent lungworm infections in herds of dairy cows in The Netherlands
Vet. Parasitol. 53, 263-267

FERNANDEZ, A. S., C. A. FIEL u. P. E. STEFFAN (1999):
Study on the inductive factors of hypobiosis of *Ostertagia ostertagi* in cattle
Vet. Parasitol. 81, 295-307

FLEMING, M. W. (1993):
Catecholamines during development of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*
Comp. Biochem. Physiol. [C] 104, 333-334

FRANDSEN, J. C. u. L. W. BONE (1988):
Derivatives of epinephrine, norepinephrine, octopamine and histamine formed by homogenates of *Trichostrongylus colubriformis*, a nematode parasite of ruminants
Comp. Biochem. Physiol. [C] 91, 385-387

FRANK, G. R., R. P. HERD, K. S. MARBURY u. J. C. WILLIAMS (1986):
Effects of transfer of *Ostertagia ostertagi* between northern and southern U.S.A. on the pattern and frequency of hypobiosis
Int. J. Parasitol. 16, 391-398

FRANK, G. R., R. P. HERD, K. S. MARBURY, J. C. WILLIAMS u. E. R. WILLIS (1988):
Additional investigations on hypobiosis of *Ostertagia ostertagi* after transfer between northern and southern U.S.A.
Int. J. Parasitol. 18, 171-177

FREEMAN, W. M., S. J. WALKER u. K. E. VRANA (1999):
Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential
Biotechniques 26, 112-115

FROHMAN, M. A. (1993):
Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of *full-length* complementary DNAs: thermal RACE
Methods Enzymol. 218, 340-356

FROHMAN, M. A., M. K. DUSH u. G. R. MARTIN (1988):
Rapid production of *full-length* cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002

GALAS, D. J. (2001):
Sequence interpretation: Making sense of the sequence
Science 291, 1257-1260

GATONGI, P. M., R. K. PRICHARD, S. RANJAN, J. M. GATHUMA, W. K. MUNYUA, H. CHERUIYOT u. M. E. SCOTT (1998):
Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya
Vet. Parasitol. 77, 49-61

GEMS, D. (1999):
Nematode ageing: Putting metabolic theories to the test
Curr. Biol. 9, R614-R616

GEORGI, L. L., P. S. ALBERT u. D. L. RIDDLE (1990):
daf-1, a *C. elegans* gene controlling *dauer larva* development, encodes a novel receptor protein kinase
Cell 61, 635-645

GERISCH, B., C. WEITZEL, C. KOBER-EISERMANN, V. ROTTIERS u. A. ANTEBI (2001):
A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span
Dev. Cell 1, 841-851

GIANGASPERO, M., F. A. BAHHADY, G. ORITA u. L. GRUNER (1992):
Summer-arrested development of abomasal trichostrongylids in Awassi sheep in semi-arid areas of north-west Syria
Parasitol. Res. 78, 594-597

GIBBONS, L. M. u. J. HØGLUND (2002):
Dictyocaulus capreolus n. sp. (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) from roe deer, *Capreolus capreolus* and moose, *Alces alces* in Sweden
J. Helminthol. 76, 1-7

GIBBONS, L. M. u. L. F. KHALIL (1988):
A revision of the species *Dictyocaulus* Railliet & Henry, 1907 (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) with the description of *D. africanus n. sp.* from African artiodactylids
Journal of African Zoology 102, 151-175

GIBBS, H. C. (1968):
Some factors involved in the `spring rise´ phenomen in sheep
in: E. J. L. SOULSBY (Hrsg.): The reaction of the host to parasitism
N. G. ELWERT, Universitäts- und Verlagsbuchhandlung, Marburg, S.160-173

GIBBS, H. C. (1973):
Transmission of parasites with reference to the strongyles of domestic sheep and cattle
Can. J. Zool. 51, 281-289

GIBBS, H. C. (1982):
Mechanisms of survival of nematode parasites with emphasis on hypobiosis
Vet. Parasitol. 11, 25-48

GIBBS, H. C. (1986):
Hypobiosis in parasitic nematodes - an update
Adv. Parasitol. 25, 129-174

GIBSON, T. E. u. G. EVERETT (1978):
Further investigations on the effect of different levels of larval intake on the output of eggs of *Ostertagia circumcincta* in lambs
Res. Vet. Sci. 24, 169-173

GIL, E. B., L. E. MALONE, L. X. LIU, C. D. JOHNSON u. J. A. LEES (1999):
Regulation of the insulin-like developmental pathway of *Caenorhabditis elegans* by a homolog of the PTEN tumor suppressor gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2925-2930

GOH, S. L. u. K. G. DAVEY (1985):
Occurence of noradrenaline in the central nervous system of *Phocanema decipiens* and its possible role in ecdysis
Can. J. Zool. 221, 161-163

GOLDEN, J. W. u. D. L. RIDDLE (1982):
A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Science 218, 578-580

GOLDEN, J. W. u. D. L. RIDDLE (1984a):
A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 819-823

GOLDEN, J. W. u. D. L. RIDDLE (1984b):
The *Caenorhabditis elegans dauer larva*: developmental effects of pheromone, food, and temperature
Dev. Biol. 102, 368-378

GOLDEN, J. W. u. D. L. RIDDLE (1985):
A gene affecting production of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone
Mol. Gen. Genet. 198, 534-536

GOMEZ-ESCOBAR, N., W. F. GREGORY u. R. M. MAIZELS (2000):
Identification of *tgh*-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans daf*-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*
Infect. Immun. 68, 6402-6410

GOMEZ-ESCOBAR, N., B. A. van DEN u. R. MAIZELS (1997):
A member of the TGF-beta receptor gene family in the parasitic nematode *Brugia pahangi*
Gene 199, 101-109

GOTHE, R. (1983):
Zur *Dictyocaulus arnfieldi*-Infektion der Equiden
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 96, 364-368

GOTHE, R. u. R. KANDELS (1984):
Lungenwürmer bei Schafen in Hessen: Untersuchungen zur Befallshäufigkeit von *Dictyocaulus filaria* und Protostrongyliden sowie verschiedene Haltungsformen
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 97, 35-366

GOTTLIEB, S. u. G. RUVKUN (1994):
daf-2, *daf*-16 and *daf*-23: genetically interacting genes controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 137, 107-120

GOUDIE, A. C., N. A. EVANS, K. A. GRATION, B. F. BISHOP, S. P. GIBSON, K. S. HOLDOM, B. KAYE, S. R. WICKS, D. LEWIS, A. J. WEATHERLEY et al. (1993):
Doramectin - a potent novel endectocide
Vet. Parasitol. 49, 5-15

GRÄFNER, G. (1987):
Zum epizootiologischen Verlauf von Ostertagiose-Dictyokaulose-Erkrankungen bei Jungrinderherden in den Jahren 1980 bis 1984 in den nördlichen Weidegebieten der DDR
Monatsh. Veterinärmed. 42, 5-15

GRANT, A. G., R. M. FLOMEN, M. L. TIZARD u. D. A. GRANT (1992):
Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma λ gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1α in tumor cells
Int. J. Cancer 50, 740-745

GRAVELEY, B. R. (2001):
Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world
Trends Genet. 17, 100-107

GRENACHE, D. G., I. CALDICOTT, P. S. ALBERT, D. L. RIDDLE u. S. M. POLITZ (1996):
Environmental induction and genetic control of surface antigen switching in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12388-12393

GRIFFIN, T. J., S. P. GYGI, T. IDEKER, B. RIST, J. ENG, L. HOOD u. R. AEBERSOLD (2002):
Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Proteomics 1, 323-333

GUIMARAES, M. J., F. LEE, A. ZLOTNIK u. T. McCLANAHAN (1995):
Differential display by PCR: novel findings and applications
Nucleic Acids Res. 23, 1832-1833

GUNTHER, C. V., L. L. GEORGI u. D. L. RIDDLE (2000):
A *Caenorhabditis elegans* type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development
Development 127, 3337-3347

GUPTA, R. P. u. H. C. GIBBS (1970):
Epidemiological investigations on *Dictyocaulus viviparus* (Bloch, 1782) infection in cattle
Can. vet. J. 11, 149-156

GUPTA, R. P. u. H. C. GIBBS (1976):
A note on the morphogenesis of inhibited stages of *Dictyocaulus viviparus* (Bloch 1782)
Haryana Agricultural University Journal of Research 6, 205-207

GURSKAYA, N. G., L. DIATCHENKO, A. CHENCHIK, P. D. SIEBERT, G. KHASPEKOV, K. A. LUKYANOV, L. L. VAGNER, O. D. ERMOLAEVA, K. LUKYANOV u. E. D. SVERDLOV (1996):
Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transkripts induced by phytohemaglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetat
Anal. Biochem. 240, 90-97

HADAS, E. u. M. STANKIEWICZ (1998):
Superoxide dismutase and total antioxidant status of larvae and adults of *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*
Parasitol. Res. 84, 646-650

HANSEN-HAGGE, T. E., U. TREFZER, A. S. ZU REVENTLOW, K. KALTOFT u. W. STERRY (2001):
Identification of sample-specific sequences in mammalian cDNA and genomic DNA by the novel ligation-mediated subtraction (Limes)
Nucleic Acids Res. 29, e20

HARRIS, A. J., J. G. SHADDOCK, M. G. MANJANATHA, J. A. LISENBEY u. D. A. CASCIANO (1998):
Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats
Carcinogenesis 19, 1451-1458

HASSLINGER, M. A. (1989):
Dictyocaulus arnfieldi in equines, present situation and future aspects
J. Egypt. Vet. Med. Ass. 49, 445-455

HAWDON, J. M. u. B. DATU (2003):
The *second messenger* cyclic GMP mediates activation in *Ancylostoma caninum* infective larvae
Int. J. Parasitol. 33, 787-793

HEDGECOCK, E. M. u. J. N. THOMSON (1982):
A gene required for nuclear and mitochondrial attachment in the nematode *C. elegans*
Cell 30, 321-330

HENDERSON, S. T. u. T. E. JOHNSON (2001):
daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Curr. Biol. 11, 1975-1980

HENRIKSEN, S. A., M. LARSEN, J. GRONVOLD, P. NANSEN u. J. WOLSTRUP (1997):
Nematode-trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus*
Acta vet. scand. 38, 175-179

HERMAN, R. K. (1987):
Mosaic analysis of two genes that affect nervous system structure in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 116, 377-388

HIEPE, T. (1985):
Lehrbuch der Parasitologie. Veterinärmedizinische Helminthologie
Verlag Fischer, Jena, Bd.3, S.419

HØGLUND, J., C. SVENSSON u. A. HESSLE (2001):
A field survey on the status of internal parasites in calves on organic dairy farms in southwestern Sweden
Vet. Parasitol. 99, 113-128

HØGLUND, J., E. WILHELMSSON, D. CHRISTENSSON, T. MORNER, P. WALLER u. J. G. MATTSSON (1999):
ITS2 sequences of *Dictyocaulus species* from cattle, roe deer and moose in Sweden: molecular evidence for a new species
Int. J. Parasitol. 29, 607-611

HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON u. D. H. GELFAND (1991):
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276-7280

HOPPE, P. E. u. R. H. WATERSTON (2000):
A region of the myosin rod important for interaction with paramyosin in *Caenorhabditis elegans* striated muscle
Genetics 156, 631-643

HORAK, I. G. (1981):
The similarity between arrested development in parasitic nematodes and diapause in insects
J. Afr. Vet. Med. Assoc. 52, 299-303

HUBANK, M. u. D. G. SCHATZ (1994):
Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA
Nucleic Acids Res. 22, 5640-5648

HUBANK, M. u. D. G. SCHATZ (1999):
cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes
Methods Enzymol. 303, 325-349

HUBERT, J., D. KERBOEUF, B. CARDINAUD, F. BLOND-RIOU u. R. FOURNIER (1997):
Persistent efficacy of topical moxidectin against *Dictyocaulus viviparus* and *Ostertagia ostertagi*
Vet. Parasitol. 68, 187-190

HUBERT, J., D. KERBOEUF, B. CARDINAUD u. F. BLOND (1995):
Persistant efficacy of moxidectin against *Dictyocaulus viviparus* and *Ostertagia ostertagi* in cattle
Vet. Rec. 136, 223-224

INDERBITZIN, F. (1976):
Experimentell erzeugte Entwicklungshemmung von *Dictyocaulus viviparus* des Rindes
Zürich, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

INGEBRITSEN, T. S. u. P. COHEN (1983):
Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation
Science 221, 331-338

INOUE, T. u. J. H. THOMAS (2000a):
Suppressors of transforming growth factor-beta pathway mutants in the *Caenorhabditis elegans* dauer formation pathway
Genetics 156, 1035-1046

INOUE, T. u. J. H. THOMAS (2000b):
Targets of TGF-beta signaling in *Caenorhabditis elegans* dauer formation
Dev. Biol. 217, 192-204

IWAMA, A., P. ZHANG, G. J. DARLINGTON, S. R. McKERCHER, R. MAKI u. D. G. TENEN (1998):
Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha.
Nucleic Acids Res. 26, 3034-3043

JARRETT, W. F. H., F. W. JENNINGS, W. I. M. McINTYRE, W. MULLIGAN u. G. M. URQUHART (1955a):
Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection. Passive immunisation
Vet. Rec. 67, 291-297

JARRETT, W. F. H., W. F. M. McINTYRE, F. W. JENNINGS u. W. MULLIGAN (1957):
The natural history of parasitic bronchitis with notes on prophylaxis and treatment
Vet. Rec. 69 1329-1340

JARRETT, W. F. H., F. W. JENNINGS, B. MARTIN, W. I. M. McINTYRE, W. MULLIGAN, N. C. C. SHARP u. G. M. URQUART (1958):
A field trial of a parasitic bronchitis vaccine
Vet. Rec. 70, 451-453

JARRETT, W. F. H., F. W. JENNINGS, W. I. M. McINTYRE, W. MULLIGAN, B. A. C. THOMAS u. G. M. URQUHART (1959):
Immonological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection. The immunity resulting from experimental infection
Immunol. 2, 252-267

JARRETT, W. F. H., W. I. M. McINTYRE u. G. M. URQUARD (1954):
Husk in cattle. A review of a year´s work
Vet. Rec. 66, 676

JARRETT, W. F. H., W. I. M. McINTYRE u. G. M. URQUHART (1955b):
Some factors in the epidemiology of parasitic bronchitis in cattle
Vet. Rec. 820-824

JIA, K., P. S. ALBERT u. D. L. RIDDLE (2002):
DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity
Development 129, 221-231

JOHNSON, T. E. (2001):
SAGE thoughts on aging
Genome Res. 11, 1323-1324

JONES, R. M., N. B. LOGAN, A. J. WEATHERLEY, A. S. LITTLE u. C. D. SMOTHERS (1993):
Activity of doramectin against nematode endoparasites of cattle
Vet. Parasitol. 49, 27-37

JONES, S. J. M., D. L. RIDDLE, A. T. POUZYREV, V. E. VELCULESCU, L. HILLIER, S. R. EDDY, S. L. STRICKLIN, D. L. BAILLIE, R. WATERSTON u. M. A. MARRA (2001):
Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*
Genome Res. 11, 1346-1352

JØRGENSEN, R. J. (1973):
In vitro effect of bile on the motility of *Dictyocaulus viviparus* third stage larvae
Acta vet. scand. 14, 341-343

JØRGENSEN, R. J. (1980):
Dictyocaulus viviparus: migration in agar of larvae subjected to a variety of physicochemical exposures
Exp. Parasitol. 49, 106-115

JØRGENSEN, R. J. u. C. P. OGBOURNE (1985):
Bovine dictyocaulosis- a review and annotated bibliography
Verlag Commonwealth Agriculture Bureaux, Slough, UK, S. 2

JØRGENSEN, R. J., H. RONNE, C. HELSTED u. A. R. ISKANDER (1982):
Spread of infective *Dictyocaulus viviparus* larvae in pasture and to grazing cattle: experimental evidence of the role of *Pilobolus* fungi
Vet. Parasitol. 10, 331-339

KAGAWA, H., H. IMADZU, K. KURODA, S. MATSUMOTO, M. OGASAWARA u. Y. SAKUBE (1995):
Muscle gene structures and expressions in pharyngeal and body wall muscles of *Caenorhabditis elegans*
International *C. elegans* Meeting 1995, Abstract 300

KAPILOFF, M. S., J. M. MATHIS, C. A. NELSON, C. R. LIN u. M. G. ROSENFELD (1991):
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase mediates a pathway for transcriptional regulation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3710-3714

KIMURA, K. D., H. A. TISSENBAUM, Y. LIU u. G. RUVKUN (1997):
daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*
Science 277, 942-946

KISIEL, M. J., K. H. DEUBERT u. B. M. ZUCHERMAN (1976):
Biogenic amines in the free-living nematode *Caenorhabditis briggsae*
Exp. Aging Res. 2, 37-44

KLASS, M. u. D. HIRSH (1976):
Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*
Nature 260, 523-525

KLESIUS, P. H. (1988):
Immunity to *Ostertagia ostertagi*
Vet. Parasitol. 27, 159-167

KLOOSTERMAN, A., H. W. PLOEGER u. K. FRANKENA (1991):
Age resistance in calves to *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*
Vet. Parasitol. 39, 101-113

KNOX, D. P. u. D. G. JONES (1992):
A comparison of superoxide dismutase (SOD, EC:1.15.1.1) distribution in gastro-intestinal nematodes
Int. J. Parasitol. 22, 209-214

KOHLER-BELLMER, S. (1991):
Weitere Untersuchungen zum Einsatz des ELISA in Epizootiologie und Diagnostik bei *Dictyocaulus viviparus* im Landkreis Diepholz
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KOOYMAN, F. N. J. u. M. EYSKER (1995):
Analysis of proteins related to conditioning for arrested development and differentiation in *Haemonchus contortus* by two-dimensional gel electrophoresis
Int. J. Parasitol. 25, 561-568

KOZAK, M. (1986a):
Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2850-2854

KOZAK, M. (1986b):
Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes
Cell 44, 283-292

KOZAK, M. (1987a):
An analysis of 5´-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs
Nucleic Acids Res. 15, 8125-8148

KOZAK, M. (1987b):
At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells
J. Mol. Biol. 196, 947-950

KOZAK, M. (1987c):
Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eukaryotic ribosomes
Mol. Cell. Biol. 7, 3438-3445

KOZAK, M. (1999):
Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes
Gene 234, 187-208

KOZAK, M. (2002):
Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation
Gene 299, 1-34

KUANG, W. W., D. A. THOMPSON, R. V. HOCH u. R. J. WEIGEL (1998):
Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line
Nucleic Acids Res. 26, 1116-1123

KUTYAVIN, I. V., I. A. AFONINA, A. MILLS, V. V. GORN, E. A. LUKHTANOV,
E. S. BELOUSOV, M. J. SINGER, D. K. WALBURGER, S. G. LOKHOV, A. A. GALL et al. (2000):
3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures
Nucleic Acids Res. 28, 655-661

KUTYAVIN, I. V., E. A. LUKHTANOV, H. B. GAMPER u. R. B. MEYER (1997):
Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization
Nucleic Acids Res. 25, 3718-3723

KUTZER, E. (1988):
Bedeutung parasitärer Wechselinfektionen bei Haus- und Wildwiederkäuern
Monatsh.Veterinärmed. 43, 577-580

LARSEN, M. (1999):
Biological control of helminths
Int. J. Parasitol. 29, 139-146

LARSEN, P. L. (1993):
Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8905-8909

LARSEN, P. L., P. S. ALBERT u. D. L. RIDDLE (1995):
Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 139, 1567-1583

LEE, D. L. u. R. C. KO (1991):
Catecholaminergic neurons in *Trichinella spiralis* (Nematoda)
Parasitol. Res. 77, 269-270

LEE, R. Y., J. HENCH u. G. RUVKUN (2001):
Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the *daf*-2 insulin-like signaling pathway.
Curr. Biol. 11, 1950-1957

LEE, S. J. u. J. T. STULL (1998):
Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase
J. Biol. Chem. 273, 27430-27437

LI, J., X. ZHU, F. T. ASHTON, H. R. GAMBLE u. G. A. SCHAD (2001):
Sensory neuroanatomy of a passively ingested nematode parasite, *Haemonchus contortus*: amphidial neurons of the third-stage larva
J. Parasitol. 87, 65-72

LI, J., X. ZHU, R. BOSTON, F. T. ASHTON, H. R. GAMBLE u. G. A. SCHAD (2000):
Thermotaxis and thermosensory neurons in infective larvae of *Haemonchus contortus*, a passively ingested nematode parasite
J. Comp. Neurol. 424, 58-73

LI, W., S. G. KENNEDY u. G. RUVKUN (2003):
daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway
Genes Dev. 17, 844-858

LIANG, P., L. AVERBOUKH u. A. B. PARDEE (1993):
Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization
Nucleic Acids Res. 21, 3269-3275

LIANG, P., D. BAUER, L. AVERBOUKH, P. WARTHOE, M. ROHRWILD, H. MULLER, M. STRAUSS u. A. B. PARDEE (1995):
Analysis of altered gene expression by differential display
Methods Enzymol. 254, 304-321

LIANG, P. u. A. B. PARDEE (1992):
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction
Science 257, 967-971

LIANG, P. u. A. B. PARDEE (1997):
Differential display. A general protocol
Methods Mol. Biol. 85, 3-11

LIN, K., J. B. DORMAN, A. RODAN u. C. KENYON (1997):
daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*
Science 278, 1319-1322

LIN, K., H. HSIN, N. LIBINA u. C. KENYON (2001):
Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling
Nat. Genet. 28, 139-145

LINTS, R. u. S. W. EMMONS (2002):
Regulation of sex-specific differentiation and mating behavior in *C. elegans* by a new member of the DM domain transcription factor family
Genes Dev. 16, 2390-2402

LISITSYN, N., N. LISITSYN u. M. WIGLER (1993):
Cloning the differences between two complex genomes
Science 259, 946-951

LISITSYN, N. A. (1995):
Representational difference analysis: finding the differences between genomes
Trends Genet. 11, 303-307

LUCE, M. J. u. P. D. BURROWS (1998):
Minimizing false positives in differential display
Biotechniques 24, 766-8, 770

LUKYANOV, K. A., G. A. LAUNER, V. S. TARABYKIN, A. G. ZARAISKY u. S. A. LUKYANOV (1995):
Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by polymerase chain reaction
Anal. Biochem. 229, 198-202

LUUKKONEN, B. G. M., W. TAN u. S. SCHWARTZ (1995):
Efficiency of reinitiation of translation on HIV type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream ORF and by intercistronic distance
J. Virol. 69, 4086-4094

MAGAT, W. J., W. J. HUBBARD u. E. L. JESKA (1972):
Ascaris suum: quantitative chemical analysis of eggs and larvae
Exp. Parasitol. 32, 102-108

MARIUS, V., S. BERNARD, J. P. RAYNAUD, P. PERY u. G. LUFFAU (1979):
Dictyocaulus viviparus in calves: quantification of antibody activities in sera and respiratory secretions by immuno-enzymatic analysis
Ann. Rech. Vet. 10, 56-63

MASSEY, H. C., JR., C. C. BALL u. J. B. LOK (2001):
PCR amplification of putative *gpa*-2 and *gpa*-3 orthologs from the (A+T)-rich genome of *Strongyloides stercoralis*
Int. J. Parasitol. 31, 377-383

MATHIEU-DAUDE, F., T. TRENKLE, J. WELSH, B. JUNG, T. VOGT u. M. McCLELLAND (1999):
Identification of differentially expressed genes using RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction
Methods Enzymol. 303, 309-324

MATZ, M., D. SHAGIN, E. BOGDANOVA, O. BRITANOVA, S. LUKYANOV, L. DIATCHENKO u. A. CHENCHIK (1999):
Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR
Nucleic Acids Res. 27, 1558-1560

McCLELLAND, M., F. MATHIEU-DAUDE u. J. WELSH (1995):
RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR
TIG 11, 242-246

MICHEL, J. F. (1955):
Studies on host resistance to *dictyocaulus* infections. I. The phenomen of inhibited development
J. Comp. Path. 65, 149-158

MICHEL, J. F. (1967):
Methods for testing anthelmintics
Vet. Rec. 80, 366

MICHEL, J. F. (1976):
The epidemiology and control of some nematode infections in grazing cattle
Adv. Parasitol. 14, 355-397

MICHEL, J. F. (1978):
Topical themes in the study of arrested development
in: F. H. M. BORGSTEEDE, J. ARMOUR, u. J. JANSEN (Hrsg.): Facts and Reflections III
Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande S.7-17

MICHEL, J. F., M. B. LANCASTER u. C. HONG (1979):
The effect of age, acquired resistance, pregnancy and lactation on some reactions of cattle to infection with *Ostertagia ostertagi*
Parasitology 79, 157-168

MICHEL, J. F., A. MACKENZIE, C. D. BRACEWELL, R. L. CORNWELL, J. ELLIOT, N. HEBERT u. H. H. HOLMAN (1965):
Duration of the aquired resistance of calves to infection with *Dictyocaulus viviparus*
Res. Vet. Sci. 6, 344-395

MICHEL, J. F. u. A. SHAND (1955):
A field study of the epidemiology and manifestations of parasitic bronchitis in adult cattle
Vet. Rec.67, 249-266

MIHAYLOVA, V. T., C. Z. BORLAND, L. MANJARREZ, M. J. STERN u. H. SUN (1999):
The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7427-7432

MILLER, J. E. u. F. OLSON (1990):
Critical evaluation of oxfendazole against inhibited *Ostertagia ostertagi*
Proc. Meeting Amer. Assoc. Vet. Parasitol., San Antonio, USA (Abstract), S.14

MITCHELL, G. F. (1982):
Host-protective immune response to parasites and evasion by parasites: generalisation and approaches to analysis
in: SYMONS, L. E. A., A. D. DONALD u. J. K. DINEEN (Hrsg): Biology and Control of Endoparasites
Academic Press, Sydney, Australien, S.331-341

MODREK, B. u. C. LEE (2002):
A genomic view of alternative splicing
Nat. Genet. 30, 13-19

MOE, T. K., J. ZILIANG, A. BARATHI u. R. W. BEUERMAN (2001):
Differential expression of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in postnatal rabbit sclera
Curr. Eye Res. 23, 44-50

MOORE, J., L. TETLEY u. E. DEVANEY (2000):
Identification of abundant mRNAs from the third stage larvae of the parasitic nematode, *Ostertagia ostertagi*
Biochem. J. 347 Pt 3, 763-770

MORI, I. u. Y. OHSHIMA (1995):
Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*
Nature 376, 344-348

MORRIS, J. Z., H. A. TISSENBAUM u. G. RUVKUN (1996):
A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*
Nature 382, 536-539

MURAKAMI, M., M. KOGA u. Y. OHSHIMA (2001):
DAF-7/TGF-beta expression required for the normal larval development in *C. elegans* is controlled by a presumed guanylyl cyclase DAF-11
Mech. Dev. 109, 27-35

MYERS, R. M. (1993):
The pluses of subtraction
Science 259, 942-943

NDAO, M., V. S. PANDEY, J. ZINSSTAG u. K. PFISTER (1995):
Helminth parasites and hypobiosis of nematodes in N'Dama cattle during the dry season in The Gambia
Vet. Parasitol. 60, 161-166

NELSON, F. K., P. S. ALBERT u. D. L. RIDDLE (1983):
Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system
J. Ultrastruct. Res 82, 156-171

NEVINS, J. R. (1983):
The pathway of eukaryotic mRNA formation
Ann. Rech. Biochem. 52, 441-466

O'NEILL, M. J. u. A. H. SINCLAIR (1997):
Isolation of rare transcripts by representational difference analysis
Nucleic Acids Res. 25, 2681-2682

OAKLEY, G. A. (1983):
The epidemiology, control and treatment of parasitic bronchitis in cattle
Proc. Brit. Cattle Vet. Ass 82/83, 97-114

OAKLEY, G. A. (1993):
Calfhood vaccination for dictyocaulosis
Vet. Rec. 133, 603

OGG, S., S. PARADIS, S. GOTTLIEB, G. I. PATTERSON, L. LEE, H. A. TISSENBAUM u. G. RUVKUN (1997):
The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*
Nature 389, 994-999

PAPE, M. (1999):
Charakterisierung des ß-Tubulin-Gens der kleinen Strongyliden des Pferdes
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

PARADIS, S., M. AILION, A. TOKER, J. H. THOMAS u. G. RUVKUN (1999):
A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*
Genes Dev. 13, 1438-1452

PARADIS, S. u. G. RUVKUN (1998):
Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor
Genes Dev. 12, 2488-2498

PARFITT, J. W. u. I. J. SINCLAIR (1967):
Cross resistance to *Dictyocaulus viviparus* produced by *Dictyocaulus filaria* infections in calves
Res. Vet. Sci. 8, 6-19

PATTERSON, G. I., A. KOWEEK, A. WONG, Y. LIU u. G. RUVKUN (1997):
The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway
Genes Dev. 11, 2679-2690

PATTERSON, G. I. u. R. W. PADGETT (2000):
TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development
Trends Genet. 16, 27-33

PECCOUD, J. u. C. JACOB (1996):
Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction
Biophys. J 71, 101-108

PELLETIER, J. u. N. SONENBERG (1988):
Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA
Nature 334, 320-325

PERKINS, L. A., E. M. HEDGECOCK, J. N. THOMSON u. J. G. CULOTTI (1986):
Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Dev. Biol. 117, 456-487

PFEIFFER, H. (1971):
Zur Kenntnis der Dictyocaulose des Rindes
Wien. tierärztl. Monatsschr. 58, 54-63

PFEIFFER, H. (1976):
Zur verzögerten Entwicklung des Rinderlungenwurmes, *Dictyocaulus viviparus*
Wien. tierärztl. Mschr. 63, 54-55

PFEIFFER, H. u. R. SUPPERER (1980):
Die Dictyocaulose des Rindes
Wien. tierärztl. Mschr. 58, 14-28 u. 54-63

PIANO, F., A. J. SCHETTER, D. G. MORTON, K. C. GUNSALUS, V. REINKE, S. K. KIM u. K. J. KEMPHUES (2002):
Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*
Curr. Biol. 12, 1959-1964

PIENTA, K. J. u. E. D. SCHWAB (2000):
Modified differential display technique that eliminates radioactivity and decreases screening time
Biotechniques 28, 272-277

PLOEGER, H. W. (2002):
Dictyocaulus viviparus: re-emerging or never been away?
Trends Parasitol. 18, 329-332

POPHAM, J. D. u. J. M. WEBSTER (1978):
An alternative interpretation of the fine structure of the basal zone of the cuticule of the *dauer larva* of the nematode *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)
Can. J. Zool. 56, 1556-1563

POUPLARD, L. (1968):
Eine rationelle Bekämpfung des Lungenwurmbefalls
Veterinärmed. Nachr. 1, 3-19

PRESIDENTE, P. J. A. u. S. E. KNAPP (1973):
Susceptibility of cattle to an isolate of *Dictyocaulus viviparus* from black-tailed deer
J. Wildl. Dis. 9, 41-43

PRESIDENTE, P. J. A., D. E. WORLEY u. CATIN J.E. (1972):
Cross-transmission experiments with *Dictyocaulus viviparus* isolated from Rocky Mountain elk and cattle
J. Wildl. Dis. 9, 41-43

PRICHARD, R. K., A. D. DONALD u. D. R. HENNESSY (1974):
The effect of corticosteroid treatment on the development of inhibited *Ostertagia ostertagi* larvae
Res. Vet. Sci. 16, 267-269

PROUD, C. G. (1986):
Guanine nucleotides, protein phosphorylation and the control of translation
TIBS 11, 73-77

RAYMOND, C. S., C. E. SHAMU, M. M. SHEN, K. J. SEIFERT, B. HIRSCH, J. HODGKIN u. D. ZARKOWER (1998):
Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes
Nature 391, 691-695

REBRIKOV, D. V., O. BRITANOVA, N. GURSKAYA, K. A. LUKYANOV, V. S. TARABYKIN u. S. A. LUKYANOV (2000):
Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization
Nucleic Acids Res. 28, e90

REHBEIN, S., M. VISSER u. R. WINTER (2003):
Helminth infection in cattle from Schleswig-Holstein (Germany) after one grazing season
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 116, 41-44

REINKE, V., H. E. SMITH, J. NANCE, J. WANG, J. van DOREN, R. BEGLEY, S. J. M. JONES, E. B. DAVIS, S. SCHERER, S. WARD u. ET AL. (2000):
A global profile of germline gene expression in *C. elegans*
Mol. Cell 6, 605-616

REN, P., C. S. LIM, R. JOHNSEN, P. S. ALBERT, D. PILGRIM u. D. L. RIDDLE (1996):
Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog
Science 274, 1389-1391

RICKLING, S. (1999):
Vergleichende Untersuchungen zur Genexpression persistierender und nicht persistierender Stadien von *Dictyocaulus viviparus*
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

RIDDLE, D. L., M. M. SWANSON u. P. S. ALBERT (1981):
Interacting genes in nematode *dauer larva* formation
Nature 290, 668-671

ROBERTS, L. S. u. D. FAIRBAIRN (1965):
Metabolic studies on adult *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda: *Trichostrongyloidea*)
J. Parasitol. 51, 129-138

ROGERS, W. P. u. R. HEAD (1972):
The effect of the stimulus for infection on hormones in *Haemonchus contortus*
Comp. Gen. Pharmacol. 3, 6-10

ROMMEL, M. u. T. SCHNIEDER (1989):
Neue Anthelminthika und neue Behandlungssysteme zur Bekämpfung der Weideparasitosen der Rinder
Angew. Parasitol 30, 101-109

ROUAULT, J. P., P. E. KUWABARA, O. M. SINILNIKOVA, L. DURET, D. THIERRY-MIEG u. M. BILLAUD (1999):
Regulation of *dauer larva* development in *Caenorhabditis elegans* by *daf*-18, a homologue of the tumour suppressor PTEN
Curr. Biol. 9, 329-332

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS u. H. A. ERLICH (1988):
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable polymerase
Science 239, 487-491

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH u. T. MANIATIS (1989):
Molecular cloning: A laboratory manual
2. Aufl .Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. v. u. T. SCHNIEDER (1999):
Morphology of inhibited larvae of the bovine lungworm Dictyocaulus viviparus
J. Helminthol. 73, 79-83

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. v., A. HARDER, T. SCHNIEDER, J. KALBE u. N. MENCKE (2000):
In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A
Parasitol. Res. 86, 194-199

SANGER, F., S. NICKLEN u. A. R. COULSON (1977):
DNA-sequencing with chain termination inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

SARGENT, T. D. u. I. B. DAWID (1983):
Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*
Science 222, 135-139

SCHACKWITZ, W. S., T. INOUE u. J. H. THOMAS (1996):
Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*
Neuron 17, 719-728

SCHÄFER, M. (1992):
Das poly(A)-Ende der mRNA. Seine Rolle in der Genexpression
Biol. Unserer Zeit 1, 39-44

SCHILLHORN van VEEN, T. W. u. R. A. A. OGUNSUSI (1978):
Periparturient and seasonal rise in the trichostrongylid egg output of infected ewes during the dry season in Northern Nigeria
Vet. Parasitol. 4, 377-383

SCHNEIDER, K., R. KLAAS, B. KASPERS u. P. STAEHELI (2001):
Chicken interleukin-6
Eur J Biochem 268, 4200-4206

SCHNIEDER, T. (1992):
Dictyocaulus viviparus: Isolation and characterization of a recombinant antigen with potential for immunodiagnosis
Int. J. Parasitol. 22, 933-938

SCHNIEDER, T. (1993a):
A dipstick immunoassay using a recombinant antigen for the rapid diagnosis of bovine dictyocaulosis
Res. Vet. Sci. 54, 278-282

SCHNIEDER, T. (1993b):
The diagnostic antigen encoded by gene fragment Dv3-14: a major sperm protein of *Dictyocaulus viviparus*
Int. J. Parasitol. 23, 383-389

SCHNIEDER, T. (2000):
Helminthosen der Wiederkäuer. Befall mit Nematoden
In: M.ROMMEL, J.ECKERT, J , E.KUTZER, W.KÖRTING und T.SCHNIEDER (Hrsg.):
Veterinärmedizinische Parasitologie
5. Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin, S. 267

SCHNIEDER, T. u. A. BELLMER (1993):
Seroepidemiologische Untersuchungen zur Ermittlung von Risikofaktoren bei der Dictyocaulose des Rindes
Tierärztl.Umschau 48, 11-15

SCHNIEDER, T., A. BELLMER u. F. J. KAUP (1989):
Neueste Erkenntnisse zur Ätiologie, Pathogenese und Bekämpfung der Dictyocaulose
Wien. tierärztl. Mschr. 76, 372-376

SCHNIEDER, T., A. BELLMER u. A. M. TENTER (1993):
Seroepidemiological study on *Dictyocaulus viviparus* infections in first year grazing cattle in northern Germany
Vet. Parasitol. 47, 289-300

SCHNIEDER, T., C. EPE u. G. v. SAMSON-HIMMELSTJERNA (1996a):
Species differentiation of lungworms (*Dictyocaulidae*) by polymerase chain reaction/restriction-fragment-length polymorphism of second internal transcribed spacers of ribosomal DNA
Parasitol. Res. 82, 392-394

SCHNIEDER, T., C. EPE, G. v. SAMSON-HIMMELSTJERNA u. C. KOHLMETZ (1996b):
The development of protective immunity against gastrointestinal nematode and lungworm infections after use of an ivermectin bolus in first-year grazing calves
Vet. Parasitol. 64, 239-250

SCHNIEDER, T., C. EPE, G. v. SAMSON-HIMMELSTJERNA u. C. KOHLMETZ (1996c):
Use of ivermectin bolus against gastrointestinal nematode and lungworm infections in first-year grazing calves
Appl. Parasitol 37, 1-7

SCHNIEDER, T., F. J. KAUP u. W. DROMMER (1991):
Morphological investigations on the pathology of *Dictyocaulus viviparus* infections in cattle
Parasitol. Res. 77, 260-265

SCHUMMER, M., W.-I. NG, P. S. NELSON, R. E. BUMGARNER u. L. HOOD (1997):
Inexpensive handheld device for the construction of high-density nucleic acid arrays
Biotechniques 23, 1087-1092

SELMAN, I. E. (1984):
Control measures for parasitic bronchitis in cattle
Vet. Annu. 4, 80-84

SHUMAN, S. (1991):
Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure
J. Biol. Chem. 266, 1796-1803

SHUMAN, S. (1994):
Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase
J. Biol. Chem. 269, 32678-32684

SIDDIQUI, A. A., C. S. STANLEY, P. J. SKELLY u. S. L. BERK (2000):
A cDNA encoding a nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*
Parasitol. Res. 86, 24-29

SIEBERT, P. D., A. CHENCHIK, D. E. KELLOGG, K. A. LUKYANOV u. S. A. LUKYANOV (1995):
An improved method for walking in uncloned genomic DNA
Nucleic Acids Res. 23, 1087-1088

SKRJABIN, K. I. (1931):
Dictyocauliosis of cattle in the USSR
Veterinarnyi Spetsialist na Sotsialitischeskoj Stroike 19, 23-32

SMART, D. (1988):
Catecholamine synthesis in *Ascaridia galli* (Nematoda)
Int. J. Parasitol. 18, 485-492

SMART, D. (1989):
What are the functions of the catecholamines and 5´-hxdroxytryptamine in parasitic nematodes?
in: BENNET, E. M., BEHM, C. u. C. BRYANT (Hrsg.): Comparative Biochemistry of Parasitic Helminths
1.Aufl.Chapman and Hall, London, UK, S. 25-34

SMEAL, M. G. (1982):
Bases and Approaches for Control of Nematodes in cattle
in: SYMONS, L. E. A., A. D. DONALD, J. K. DINEEN (Hrsg.): Biology and Control of Endoparasites
Academic Press, Sydney, Australien, S.187-207

SMEAL, M. G. u. A. D. DONALD (1981):
Effects on inhibition of development of the transfer of *Ostertagia ostertagi* between geographical regions of Australia
Parasitology 82, 389-399

SMEAL, M. G. u. A. D. DONALD (1982a):
Inhibited development of *Ostertagia ostertagi* in relation to production systems for cattle
Parasitology 85 (Pt 1), 21-25

SMEAL, M. G. u. A. D. DONALD (1982b):
Inhibition of development of *Ostertagia ostertagi* - effect of temperature on the infective larval stage
Parasitology 85, 27-32

SMITH, C. W. J., J. G. PATTON u. B. NADAL-GINARD (1989):
Alternative splicing in the control of gene expression
Annu. Rev. Genet. 23, 527-577

SNOW, M. I. u. P. L. LARSEN (2000):
Structure and expression of daf-12: a nuclear hormone receptor with three isoforms that are involved in development and aging in *Caenorhabditis elegans*
Biochim. Biophys. Acta 1494, 104-116

SOLIMAN, K. N. (1953):
Migration route of *Dictyocaulus viviparus* and *D. filaria* infective larvae to the lungs
J. Comp. Path. 63, 77-86

SOMPAYRAC, L., S. JANE, T. C. BURN, D. G. TENEN u. K. J. DANNA (1995):
Overcoming limitations of the mRNA display technique
Nucleic Acids Res. 23, 4738-4739

STARR, D. u. M. HAN (2002):
Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin
Science 298, 406-409

STEIN, O. D. v. (2001):
Isolation of differentially expressed genes through subtractive suppression hybridization
Methods Mol. Biol. 175, 263-278

STEIN, O. D. v., W.-G. THIES u. M. HOFMAN (1997):
A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes
Nucleic Acids Res. 25, 2598-2602

STROMBERG, B. E., G. A. AVERBECK, J. F. ANDERSON, B. W. WOODWARD,
J. CUNNINGHAM, A. BRAKE u. T. SKOGERBOE (1999):
Comparison of the persistent efficacy of the injectable and pour-on formulations of doramectin against artificially-induced infection with *Dictyocaulus viviparus* in cattle
Vet. Parasitol. 87, 45-50

STUBBS, A. P., P. D. ABEL, M. GOLDING, G. BHANGAL, Q. WANG, J. WAXMAN,
G. W. H. STAMP u. E. LALANI (1999):
Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer
American Journal of Pathology 154, 1335-1343

SUN, Y., G. HEGAMYER u. N. H. COLBURN (1994):
Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3
Cancer Res 54, 1139-1144

SWANSON, M. M. u. D. L. RIDDLE (1981):
Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans dauer larva*
Dev. Biol. 84, 27-40

SWIETLIKOWSKI, M. (1969):
Studies on immunity of calves to *Dictyocaulus viviparus* reinfection - V. Serological studies on experimental dictyocaulosis caused by normal and X-ray inactivated larvae
Acta Parasitologica Polonica 16, 100-115

SWOBODA, P., H. T. ADLER u. J. H. THOMAS (2000):
The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*
Mol. Cell 5, 411-421

TAKACS, A. M., J. A. DENKER, K. G. PERRINE, P. A. MARONEY u. T. W. NILSEN (1988):
A 22-nucleotide spliced leader sequence in the human parasitic nematode *Brugia malayi* is identical to the trans-spliced leader exon in *Caenorhabditis elegans*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7932-7936

TANG, E. D., G. NUNEZ, F. G. BARR u. K. L. GUAN (1999):
Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt
J. Biol. Chem. 274, 16741-16746

TAWE, W. N., M. L. ESCHBACH, R. D. WALTER u. K. HENKLE-DUHRSEN (1998):
Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display
Nucleic Acids Res. 26, 1621-1627

TAYLOR, E. I. (1951):
Parasitic bronchitis in cattle
Vet. Rec. 63, 859-867

TEDDER, T. F., M. STREULI, S. F. SCHLOSSMANN u. H. SAITO (1988):
Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell surface antigen of human B lymphocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 208-212

TERAMI, H., B. D. WILLIAMS, S. KITAMURA, Y. SAKUBE, S. MATSUMOTO, S. DOI, T. OBINATA u. H. KAGAWA (1999):
Genomic organization, expression and analysis of the troponin C gene *pat*-10 of *Caenorhabditis elegans*
J. Cell. Biol. 146, 193-202

THALHOFER, H. P. u. H. W. HOFER (1989):
Purification and properties of cyclic-3´,5´-GMP-dependent protein kinase from the nematode *Ascaris suum*
Archives of Biochemical Biophysics 273, 535-542

THATCHER, J. D., C. HAUN u. P. G. OKKEMA (1999):
The DAF-3 Smad binds DNA and represses gene expression in the *Caenorhabditis elegans* pharynx
Development 126, 97-107

THOMAS, J. H., D. A. BIRNBY u. J. J. VOWELS (1993):
Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 134, 1105-1117

THOMAS, R. J., WALLER P.J. u. B. R. COTTRILL (1975):
The effect of aging on the antigenicity of *Haemonchus contortus* larvae
Res. Vet. Sci. 19, 113-114

TISSENBAUM, H. A., J. HAWDON, M. PERREGAUX, P. HOTEZ, L. GUARENTE u. G. RUVKUN (2000):
A common muscarinic pathway for diapause *recovery* in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 460-465

UNGEMACH, F. R. (1994):
Anthelminthika, Ivermectin
in: W. LÖSCHER; F. R. UNGEMACH u. R. KROKER (Hrsg.): Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren
Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 258-260

URQUHART, G. M. (1985):
Field experience with the bovine lungworm vaccine. Joint IABS/WHO Symposium on Diagnostics and Vaccines for Parasitic Diseases, Stockholm, Schweden
Develop. Biol. Stand. 62, 109-112

URQUHART, G. M., W. F. H. JARRETT u. W. I. M. McINTYRE (1973):
Pathology, clinical signs, epidemiology, treatment and control
Helminth diseases of cattle, sheep and horses in Europe. Glasgow, S.23-29

VANCE, D. E. (2000):
Lipide und Membranen
in: BRANDT, U. u. H. SCHÄGGER (Hrsg.): Biochemie
4. Aufl. McGraw-Hill International Ltd., Maidenhead, UK, S. 459

VELCULESCU, V. E., L. ZHANG, B. VOGELSTEIN u. K. W. KINZLER (1995):
Serial analysis of gene expression
Science 270, 484-487

VERCRUYSSE, J. (1985):
The seasonal prevalence of inhibited development of *Haemonchus contortus* in sheep in Senegal
Vet. Parasitol. 17, 159-163

VOWELS, J. J. u. J. H. THOMAS (1992):
Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*
Genetics 130, 105-123

VOWELS, J. J. u. J. H. THOMAS (1994):
Multiple chemosensory defects in *daf*-11 and *daf*-21 mutants of *Caenorhabditis elegans*
Genetics 138, 303-316

WALHOUT, A. J. M., J. REBOUL, O. SHTANKO, N. BERTIN, P. VAGLIO, H. GE, H. LEE, L. DOUCETTE-STAMM, K. C. GUNSALUS, A. J. SCHETTER et al. (2002):
Integrating interactome, phenome and transcriptom mapping data for the *C. elegans* germline
Curr. Biol. 12, 1952-1958

WALKER, R. J., Z. BASCAL, A. R. WHITE, S. PEDDER, C. J. FRANKS, Y. MUNEOKA u. L. HOLDEN-DYE (1995):
Actions of neuroactive peptides and nitric oxide on *Ascaris*, *Achantina* and *Helix* tissues
Acta Biol. Hung. 46, 183-193

WANG, J. u. S. K. KIM (2003):
Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*
Development 130, 1621-1634

WANG, Y., C. L. LIU, J. D. STOREY, R. J. TIBSHIRANI, D. HERSCHLAG u. P. O. BROWN (2002):
Precision and functional specifity in mRNA decay
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5860-5865

WARD, S., J. N. THOMSON, J. G. WHITE u. S. BRENNER (1975):
Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*
J. Comp. Neurol. 160, 313-338

WARE, R. W., D. CLARK, K. CROSSLAND u. R. RUSSEL (1975):
The nerve ring of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Sensory input and motor output
J. Comp. Neurol. 162, 71-110

WATKINS, A. R. u. M. A. FERNANDO (1984):
Arrested development of the rabbit stomach worm *Obeliscoides cuniculi*: manipulation of the ability to arrest through processes of selection
Int. J. Parasitol. 14, 559-570

WEATHERLEY, A. J., C. HONG, T. J. HARRIS, D. G. SMITH u. N. C. HAMMET (1993):
Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves
Vet. Parasitol. 45-50

WELFORD, S. M., J. GREGG, E. CHEN, D. GARRISON, P. H. SORENSEN, C. T. DENNY u. S. F. NELSON (1998):
Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational difference analysis coupled to microarray hybridization
Nucleic Acids Res. 26, 3059-3065

WELSH, J., K. CHADA, S. S.DALAL, R. CHENG, D. RALPH u. M. McCLELLAND (1992):
Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA
Nucleic Acids Res. 20, 4965-4970

WELSH, J., J.-P. LIU u. A. EFSTRATIADIS (1990):
Cloning of PCR-amplified total cDNA: construction of a mouse oocyte cDNA library
Genet. Anal. Tech. Appl. 7, 5-17

WELSH, J. u. M. McCLELLAND (1990):
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers
Nucleic Acids Res. 18, 7213-7218

WELSH, J. u. M. McCLELLAND (1991):
Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers
Nucleic Acids Res. 19, 5275-5279

WHELAN, N. C., W. A. G. CHARLESTON, W. E. POMROY u. A. M. ALEXANDER (1995):
Evaluation of the efficacy of doramectin against an artificial infection of *Dictyocaulus viviparus* in calves
New Zeal. Vet. J. 43, 21-22

WILLETT, J. D. (1980):
Control mechanisms in nematodes
in: B. M. ZUCKERMAN (Hrsg.): Nematodes as Biological Models, Vol. 1: Behaviorial and developmental models
1. Aufl. Academic Press, New York, USA, S. 225

WILLETT, J. D. u. I. RAHIM (1978):
Determination of adenosine 3, 5-cyclic monophosphate levels in tissues of the free living nematode *Panagrellus redivivus*
Comp. Biochem. Physiol. B 60, 403-405

WILLETT, J. D., R. A. TURNER, M. McRAE u. J. A. BOLLINGER (1979):
Catecholamine sensitive adenylate cyclase activity during development and senescence in the nematode *Panagrellus redivivus*
Age 2, 126

WILLIAMS, J. C., A. DEROSA, Y. NAKAMURA u. A. F. LOYACANO (1997):
Comparative efficacy of ivermectin pour-on, albendazole, oxfendazole and fenbendazole against *Ostertagia ostertagi* inhibited larvae, other gastrointestinal nematodes and lungworm of cattle
Vet. Parasitol. 73, 73-82

WILLIAMS, J. C. u. J. W. KNOX (1988):
Epidemiology of *Ostertagia ostertagi* in warm temperate regions of the United States
Vet. Parasitol. 27, 23-38

WILLIAMS, J. C., J. W. KNOX, B. A. BAUMANN, T. G. SNIDER, M. D. KIMBALL u. T. J. HOERNER (1983):
Seasonal changes of gastrointestinal nematode populations in yearling beef cattle in Louisiana with emphasis on prevalence of inhibition in *Ostertagia ostertagi*
Int. J. Parasitol. 13, 133-143

WILLIAMS, J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI u. S. V. TINGEY (1990):
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers
Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535

WIRTHERLE, N. C. (2003):
Untersuchungen zur Verbreitung von Anthelminthikaresistenzen bei Pferden in Niedersachsen
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WOLKOW, C. A., K. D. KIMURA, M. S. LEE u. G. RUVKUN (2000):
Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system
Science 290, 147-150

WONG, K. K. u. M. McCLELLAND (1993):
Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 639-643

WRIGHT, S., J. ARMOUR u. R. G. BRUCE (1973):
Inhibited development of *Ostertagia ostertagi*
British Society for Parasitology: Proceedings 67, 16-17

YANG, G. P., D. T. ROSS, W. W. KUANG, P. O. BROWN u. R. J. WEIGEL (1999):
Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes
Nucleic Acids Res. 27, 1517-1523

YAZWINSKI, T. A., C. TUCKER u. C. FEATHERSTONE (1994):
Residual anthelmintic activity of abamectin in artificially infected calves
Vet. Rec. 134, 195

YE, Z. u. J. R. CONNOR (2000):
Identification of iron responsive genes by screening cDNA libraries from suppression subtractive hybridization with antisense probes from three iron conditions
Nucleic Acids Res. 28, 1802-1807

YI, W., J. M. ROSS u. D. ZARKOWER (2000):
mab-3 is a direct *tra*-1 target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behavior
Development 127, 4469-4480

YI, W. u. D. ZARKOWER (1999):
Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanism
Development 126, 873-881

YOKOTA, N., M. UCHIJIMA, S. NISHIZAWA, H. NAMBA u. Y. KOIDE (2001):
Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction
Stroke 32, 168-174

YU, S., L. AVERY, E. BAUDE u. D. L. GARBERS (1997):
Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3384-3387

ZHUMABAYEVA, B., L. DIATCHENKO, A. CHENCHIK u. P. D. SIEBERT (2001):
Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors
Biotechniques 30, 158-163

ZUBAY, G. (2000):
Stoffwechselintegration bei Wirbeltieren
in: BRANDT, U. u. H. SCHÄGGER (Hrsg.): Biochemie
4. Aufl. McGraw-Hill International Ltd., Maidenhead, UK, S. 685

9 Anhang

9.1 Genspezifische Primer der RACE und SL1-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)
L3ni 16 for.:	CTT GCC GAT GCG AAT CGA AAA CTG CAT GAG TT
L3ni 16 rev.:	AGC GGT CGA TTT CAA ATT GCA TAT TCT TGC GAA GAG
L3ni 16A for.:	AAG CTA GTT TGG AAG ATA CCC AAC GTC AGC TCC AAC AAG
L3ni 16A rev.:	GAA TAG CGA TGG TGT TCT GAG CTT TCT CAA GGT CAA CAA TAA G
L3ni 22 for.:	AAG AAT TTT CCG ACC AAC TCC TGA ATG TGA TAT TGG ATG T
L3ni 22 rev.:	TCA CGC GAT TTA TAA TCT CCA TAA AGA ATT CCC GAA CTT G
L3ni 51 for.:	AAC GGC GGA TGC AAG TGC GAC ATC AGA AG
L3ni 51 rev.:	GCA TTC GGC AGC GTT GTT GTA AGA GGT AAC TAC TTC GTT
L3ni 54 for.:	GGA GGT GTA GCC GCT TCG CTT AAA CTT CAT AAG CCT CTA CT
L3ni 54 rev.:	ATG ATG CCC CTT GAA TGC TAT CGC CAA AAT GAG AAT AAA T
L3ni 54A for.:	CTG GGC CGA ATT TTG AAC CGA CTT GGA AAA GAT
L3ni 54A rev.:	G ATG CCC CTT GAA TGC TAT CGC CAA AAT GAG AAT AA
L3ni 56 for.:	TGT CCG GTG ATA GTT CGC AAA GTG ATA GAT TCT ATT GCC TAT
L3ni 56 rev.:	GTT TGG CTG CGG AAG TAT ATT CGG CAG ATT CTG G
L3ni 67 for.:	ACT TGC GCA GCA TGG ATT CGA GGG TAT AAC ATC C
L3ni 67 rev.:	GGC CCG TTC ACA AAC CTG AAT AGA TGG ATC AAA GCT TC
L3ni 67:	GAG AAC GAT GAC GTC GGA ACT GCG TGA CTG GTA A
SL1 L3ni 67:	GCA CGT TGA GTT AAT AAA TCT AAG CCT CTT GAC G
L3ni 69 for.:	GGC AAA CGG TTG TCT AGC AGC TGG AGG TCA TTA TA
L3ni 69 rev.:	ATA CGT ATC GCG CCC AAT TCC AAG CGT TTA GTT TA
L3i 10 for.:	TAA TCC GAT TTC GGC GAA AAA GGC CTC ATC TAA TTG T
L3i 10 rev.:	GAC GCA GCG CTT GCA AAG CCT GAG TCT CTT T
L3i 10:	GAA CGT AAC CGC TTA CGA CGC AAA ACG CTG TCA GC
L3i 33 for.:	TCC ACG CGC CTG TGT CCC GTT CTA AAA CA
L3i 33 rev.:	GTT CAA CGG CGG AAG TTT CCC ACC ATT AGC AG

Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)
L3i 33A for.:	GGT GGC GAT GAC TAC TGG TAT TAT GAC GTC GCA TCA GAT
L3i 33A rev.:	ACT GAG GCC ATT TCA TAG TAA AAT CCA TCA GAA TTT GCG TCG TAA TA
3´L3i 33:	GTG TAC TGG ATG ATA GCA GTG CAT CGT CAT CAA TTA GTG AAG ATA A
SL1 L3i 33:	AGG CGC GTG GAG TGG ATG AGG TAT GAC A
L3i 53 for.:	TAA CGA GAC CAT TAA AAG TGT GAC TAG CGT TAC GTG TAA GAG TCT
L3i 53 rev.:	CGC TAG AAC TAC TAT GAC TGG ATG TAG TGA GAA TCT TGG TAA AAC A
L3i 53:	ACT TTC AAT CGC AAA ATA TG A AAT CAA ATC GAT TGG AAT AGC
SL1 L3i 53:	CTG GAT TCG GAA AAA GTT GTT GCA CTT CAA TGA A
L3i 75 for.:	AAC CCA ACC GCT ATT GGG ATA CAT GAA GCA AAG TTG T
L3i 75 rev.:	TGC ACC GCTTCT GTG TTA GTA GCA CTA TCG ATT ATT CGA TTA T
SL1 L3i 75:	AAC TCC GCT GAC ACC ACT TAA TCG ATT TTG
L3i 82 for.:	CAC AAA ATC GCC AAG AGC TAA TGC GGT GGT ATG A
L3i 82 rev.:	ATT TCG CGT ATC ACT GTG CTG CCT CAA CAC CAC
L3i 82:	CTT GGA GCT GTT CGG AAA CAT CAA CAG ATG GAG ATG AGA
L3i 88 for.:	AAA TAC GCT ATG CAA ACT GGT CGT TTT GAT TTC AAG TGT C
L3i 88 rev.:	AGT ACA AGA TTT GGA ATT ATC TGA GCC AGC AGG ATG TAT G AC
L3i 88A for.:	GGC AAA ATA CAA TGC AGT GAA AAG AGC TAC AAA TAC GCT ATG C
L3i 88A rev.:	TAT GAA ACA GTA CAA GAT TTG GAA TTA TCT GAG CCA GCA GGA TGT A
L3i 88:	AGG AGG TGC TCA ACC TCA GAC AAC TAA CAT TTC GAG A
SL1 L3i 88:	TGA TTC GCA ATA GTA GGC GGT AGG ATA CTC ATG AGA A
L3i 99 for.:	ACC GGC CTT GAG GGA CGA AGT ATG TCA TTG G
L3i 99 rev.:	AAC TGG CGC CGT TGG CTT TGT TAC TAC TGA CTT CTC T
L3i 99A for.:	GTC GGC GAG GAT GCT CCA TCT ATC GTT CCA AAT G
L3i 99A rev.:	GAC GCG GCA GTG ACG GTG GTA GTG ACG ACA AT
SL1 L3i 99:	TGC TGG TGG TGA AGC GCT AAT TAA TGA ATC GTC TT
L3i 100 for.:	AAT ATC GCC AAG TTT TCA ATA TGT TTG ACA TAG ATC GTA GTG GAG
L3i 100 rev.:	GTT GTC CGT GAT ATC GCC CAA CTC TCG GAG AAT ATA

9.2 Accession-Nummern differentiell transkribierten Sequenzen

L3i 10a:	AY536871
L3i 10b:	AY536872
L3i 33a:	AY 542514
L3i 33b:	AY 542513
L3i 33c:	AY570698
L3i 53:	AY570697
L3i 75a:	AY534336
L3i 75b:	AY534337
L3i 82a:	AY 542519
L3i 82b:	AY 542520
L3i 82c:	AY 542521
L3i 82d:	AY 542522
L3i 82e:	AY 542523
L3i 101:	AY 542518
L3i 88a:	AY536870
L3i 88b:	AY536869
L3i 88c:	AY536867
L3i 88d:	AY536868
L3i 88-2:	AY536866
L3i 18:	AY534889
L3i 86:	AY534890
L3i 99:	AY534891
L3i 100a:	AY 542515
L3i 100b:	AY 542516
L3i 100c:	AY 542517
L3ni 16:	AY552027
L6ni 22:	AY533126
L3ni 51:	AY533127
L3ni 56a:	AY533128
L3ni 56b:	AY533129
L3ni 56c:	AY533130
L3ni 56d:	AY533131
L3ni 56e:	AY533132
L3ni 67:	AY533133
L3ni 69/92:	AY533134

Sonstige Accession-Nummern:

L3ni 17:	AY534331
L3ni 54:	AY534330
EF-1α Nr.1:	AY534333
EF-1α Nr.2:	AY534334
EF-1α Nr.3:	AY534335
β-Tubulin:	AY 534332

9.3 Identitäten und Ähnlichkeiten der Aminosäure-Isoformen

		L3ni 56b	L3ni 56c	L3ni 56c	L3ni 56e
putatives Protein bilateralen Ursprungs (232 aa) von *C. elegans* (NP_491869.1)	Teilbereich	182 aa	157 aa	127 aa	126 aa
	Identität	48 %	52 %	55 %	54 %
	Ähnlichkeit	65 %	68 %	69 %	69 %
		L3i 75b			
Kalzium-unabhängige Phospholipase A2 (546 aa) von *C. elegans* (NP_500969.1)	Teilbereich	393 aa			
	Identität	53 %			
	Ähnlichkeit	72 %			
hypothetisches Protein (546 aa) von *C. briggsae* (CAE61557.1)	Teilbereich	438 aa			
	Identität	51 %			
	Ähnlichkeit	67 %			
		L3i 82b	**L3i 82c**	**L3i 82d**	**L3i 82e**
Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (283 aa) von *C. elegans* (NP_505563.1)	Teilbereich	190 aa	191 aa	190 aa	158 aa
	Identität	61 %	61 %	61 %	61 %
	Ähnlichkeit	72 %	72 %	72 %	72 %
Phenylethanolamin-N-Methyltransferase Homolog (315 aa) bzw. „family member“ (273 aa) von *C. elegans* (S27784 bzw. NP_498914.1)	Teilbereich	185 aa	186 aa	185 aa	135 aa
	Identität	40 %	40 %	40 %	42 %
	Ähnlichkeit	56 %	56 %	56 %	57 %
		L3i 88b	**L3i 88c**	**L3i 88d**	
Guanylyl-Cyclase (gcy-34) (686 aa) von *C. elegans* (NP_506319.1)	Teilbereich	137 aa	126 aa	112 aa	
	Identität	57 %	52 %	55 %	
	Ähnlichkeit	72 %	69 %	71 %	
gcy-32 (646 aa), lösliche Guanylyl-Cyclase (684 aa) und ein hypothetisches Protein (699 aa) von *C. elegans* (NP_506452.3; CAC35530.1; T18984)	Teilbereich	137 aa	126 aa	112 aa	
	Identität	54 %	47 %	50 %	
	Ähnlichkeit	70 %	65 %	68 %	
		L3i 100b	**L3i 100c**		
„calmodulin family member“ (202 aa) von *C. elegans* (NP_506147.1)	Teilbereich	180 aa	nicht signifikant		
	Identität	82 %			
	Ähnlichkeit	90 %			
hypothetisches Protein (201 aa) von *C. briggsae* (CAE75516.1)	Teilbereich	180 aa	181 aa		
	Identität	82 %	61 %		
	Ähnlichkeit	90 %	69 %		

9.4 Aminosäure-Alignments der differentiell transkribierten Sequenzen

9.4.1 Alignment der L3ni 22-Sequenzen

```
A     1 krksklkcsnfnnifllskffksslqmrnhlllpllvacaygyvfecldk
B     1 ..................................................

     51 cecdtddevihchngdrteinlpqgrlrgfpvigltynniwklpdettll
     51 ..................................................

    101 nkfpdlkvvdvernfnfdcdslknyeeikiisdcfkniteiervprifrp
    101 ..................................................

    151 tpecdigcqaerhyaklheyvlhlweilkqkyrnfnldetlqqvreffme
    151 ..................................................

    201 iinrvnqfgtnvqtnfkkkydgehpkyrhsnr
    201 ..........-i.if.al--------------
```

A: In Richtung verlängerte L3ni 22-Sequenz ohne Poly-A-Ende

B: In Richtung verlängerte L3ni 22-Sequenz mit Poly-A-Ende

9.4.2 Alignments der Aminosäure-Isoformen

```
L3ni 56a    1 trgftkrvvhldhylefcsnpcqistnqrssvmdrsdddaeggqaaltsm
L3ni 56b    1 ..................................................
L3ni 56c    1 ..................................................
L3ni 56d    1 ..................................................
L3ni 56e    1 ..................................................

           51 pyqcqelilygsvfadnlpdlerrltglcdpgstefhehdlsfslrtgtd
           51 ..................................................
           51 ..................................................
           51 ..................................................
           51 ..................................................

          101 pdvtirlrrrfnvdsftshqwqfryiggpepdqkcpvivrkvidsiaysh
          101 ..................................................
          101 ..................................................
          101 ..................................................
          101 ..................................................

          151 lmmdfvktlglrmdyeyiakgtvwingkmkivisqiqktekaghy---dq
          151 .........................................vaf.fdier
          151 .........................................---------
          151 ...........fie------------------------------------
          151 ..........---------------------------------------s

          198 snlkrfsdsylveisvcipesaeytsaakqlrdfadqllplveiekvdyw
          201 is..fvleefrld.ti-----------kai.kg.lthi------------
          192 -------------------knlgw.lrs..s-------------------
          165 ------.pnfi---------------------------------------
          162 qttt..r-------------------------------------------

          248 rk
          228 --
          204 --
          170 --
          169 --
```

```
L3i 10b    1 mlflslflifvaffytfntslycylllpnnmiyltqfnsitnlrasrate
L3i 10a    1 -------------------------cv.s---------------------

          51 initkiqmnsggsnisntttpsldlqvllstmpdfakltsltnmknstsn
           5 ------p...........................................

         101 anistsqsllfpsipndqlaalslglfplpgfpmfpllpmtplgsslpph
          49 ..................................................

         151 stieslglmtnanfrqnvytmkpislesrprafssaaalqrpkpattper
          99 ..................................................

         201 rrkrsrkaqdeeqessvlrmlvdeeddtpikirqlatrdldeklridaar
         149 ..................................................

         251 vlsesnpisakkassnclaelieeqpstrvalrriirdedlpdsigpdsp
         199 ..................................................

         301 frhhpkyqrkqrdseleeidgmealtafcvvsgyvpesneptesqkrdsg
         249 ..................................................

         351 fasaasskksftemmehaicrelvtae
         299 ...........................
```

```
L3i 33a    1 mycsnfhhhrydgvqtpsdaiktarekhrsvsaeeaavipeavstgteta
L3i 33b    1 ..................................................
L3i 33c    1 ..................................................

          51 drttmksqqprfyggplkgviphplhapvsrsktlawfladdlldkksap
          51 ..................................................
          51 ................................................v-

         101 vnghmktdgkishnatgkaedkkrrralrrakkneamaqfdsaemeansv
         101 ..................................................
         100 --------------------------------------------------

         151 tledlfvnerqrilnggddywyydvasdgyyyeqngakgwrrripnsamq
         151 ..................................................
         100 --------------------------------------------------

         201 rlkeqeiaqlaaanggklpplnmqtaahahallqsalfsqpalkyydans
         201 ..................................................
         100 --------------------------------------------------

         251 dgfyyemasvdgwkrrqpnksahqplssamnsgsistsgidssgtptrts
         251 ..................................................
         100 --------------------------------------------------

         301 ygaalargqiprhhcvlddssasssisednslqdvfgldaafngltmgcd
         301 ..................................................
         100 --------------------------------------------------

         351 spflplnsttnvntngncnsngitttvyrpesfplseqirpgfnadkfie
         351 ..............................g.y.................
         100 -------------------t.sl.vne.----------------------

         401 eltfseldpskvlgsvsrtpvdpwasrcggwalppfdrpttsnpslvddd
         401 ............................s.....................
         109 --------------------------------------------------

         451 dnssmllkdlekiwatpvgasyishrpspvptsilspfavrttahdtapp
         451 ...................v------------------------------
         109 --------------------------------------------------

         501 ekprctkigcgggrditkrrr
         471 ---------------------
         109 ---------------------
```

```
L3i 75a    1 gliipslrmftqqgsvgfrsycpvaqrwlsnsiptlanvssqitqsseaag
L3i 75b    1 ..................................................

          51 ilqnytgyltgainsilaktanatgifalksftdvdhaksaitetfksgi
          51 ..................................................

         101 ptntevtsytyekrisrtevtkktralvekllssesneskliniretssh
         101 ..................................................

         151 iinypptrivaaqyprliadllktvksfdtqaglrgearlcltlcgcqpa
         151 ..................................................

         201 vksrginllsidgggtrglmglevleqlekisgkkicelfdhvvgvstgs
         201 ..................................................

         251 iiaslligkgytvedcrtiyvdvskrlfsqnrlsgvsgvvlnhsyydtkk
         251 ..................................................

         301 wvkmlketigeeltlidtskesvprlsivaaivnfpviqpyafrnyeppa
         301 ..................................................

         351 grdshyrgstghylwkaiqasaaaplyfeevkldhlllqdggvvannpta
         351 ..................................................

         401 igiheakllwpeerlhcvvsvgngrsvcdfepksllsslsslqkfnriid
         401 ...........................ralrwr.----------------

         451 satnteavhmcmhdlldenvyfrlnpymsvpysldeidpqkieqmrrdak
         435 ---------------yspdic.sis-.i.lg-------------------

         501 lyvrrnmskiedasarllqkptivqlntrrfdawmdgrdyihvdryymlv
         450 -----------------------lrfr.kvitvfvefvaev---------

         551 kyfwymclkp
         468 ----------
```

```
L3i 82a   1 viifsvlfillihiliiilklcglekektkirtlsmesadgenlkqaildr
L3i 82b   1 ..................................................
L3i 82d   1 ..................................................
L3i 82c   1 ..................................................
L3i 82e   1 ..................................................

         51 dtfhkefnteaylkdfytkvedsamqmvliflpnivarigkikrvldfga
         51 ..................................................
         51 ..................................................
         51 ..................................................
         51 ..................................................

        101 gptihvaasfrnqaveiyladylpqnrqelmrwyegsssfdwshpmkmil
        101 ..................................................
        101 ..................................................
        101 ..................................................
        101 ..................................................

        151 tqegnpwndldemiritrqkvrgifhcdcfsspsvdvseqlqgmfdtvvt
        151 ..................................................
        151 ..................................................
        151 ..................................................
        151 ..............................................vkfr

        201 ifcveycck tydeyknaiknitqqireggflvmggileetwcsfggrmfs
        201 ............................----------------------
        201 ............................----------------------
        201 .............................tf-------------------
        201 .-----------------------------------------..------

        251 clyitkemmlnaieeaglriendckcimynidnmfmlcarkantisdnts
        229 -----drck.sgv.a.q---------------------------------
        229 ------------------------------------v.i.sm--------
        232 --------------------------------------------------
        204 -------------------ff..v.kly----------------------
```

```
L3i 82a    1 ----------viifsvlfilli--------------hiliilklcgleke
L3i 101    1 icdvtriwkvlvrr..eqvr..eltdlpsitrsdkl..............

          27 ktkirtlsmesadgenlkqaildrdtfhkefnteaylkdfytkvedsamq
          51 ..................................................

          77 mvliflpnivarigkikrvldfgagptihvaasfrnqaveiyladylpqn
         101 ..................................................

         127 rqelmrwyegsssfdwshpmkmiltqegnpwndldemiritrqkvrgifh
         151 ..................................................

         177 cdcfsspsvdvseqlqgmfdtvvtifcveyccktydeyknaiknitqqir
         201 ..................................................

         227 eggflvmggileetwcsfggrmfsclyitkemmlnaieeaglriendckc
         251 ..................................................

         277 imynidnmfmlcarkantisdnts
         301 ........................
```

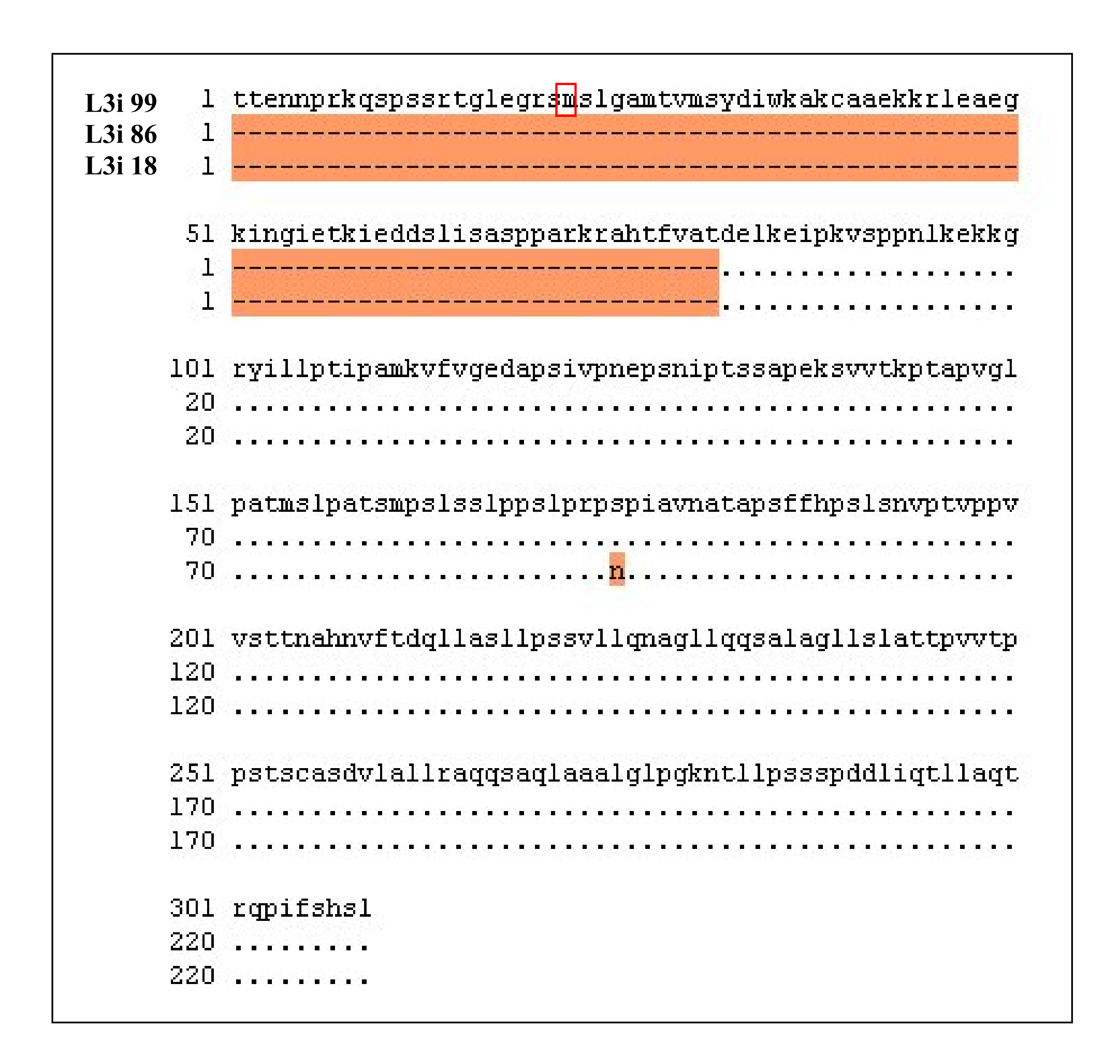
```
L3i 88b    1 ptlnlqldenneqlekvtkelefertktesvlmsilpptianhlinnehi
L3i 88c    1 ..................................................
L3i 88a    1 ..................................................
L3i 88d    1 ..................................................
L3i 88-2   1 ..................................................

          51 earmlwearlvsepvgenpvqirigintgpiiagvvtmkmpryclfgetv
          51 ..................................................
          51 ..................................................
          51 ..................................................
          51 ...-----------------------------------------------

         101 clasclemngipgkiqcseksykyamqtgrfdfkcrgrvnikgrgtmety
         101 ............................................------
         101 ..................................................
         101 ............................................------
          54 -------------------------------e.e----------------

         151 flyrslnksvweiigrerdeqywplsnqssspshttltflrivlmdmksl
         145 -------------------------------------.............
         151 ...................-------------------------------
         145 -------------------------vry...------------mfe.nqi
          57 ---------------------------------.a.vm.-----s.vpnf

         201 kmeciilnnkqpsyillaqiipnlvlfhknsaptlyqlspvs-------
         158 ..........................................-------
         170 -----.sk.sidg.----eele.g.yyseqq.tvihpagsdnsksctvs
         158 r-----------------------------------------------
          69 hs---..shsh.kdvv--.mlnd--...rfdrlvamhkvli.-------
```


L3i 99 1 ttennprkqspssrtglegrsmslgamtvmsydiwkakcaaekkrleaeg
L3i 86 1 --
L3i 18 1 --
51 kingietkieddslisaspparkrahtfvatdelkeipkvsppnlkekkg
1 -------------------------------...................
1 -------------------------------...................
101 ryillptipamkvfvgedapsivpnepsniptssapeksvvtkptapvgl
20 ....
20 ....
151 patmslpatsmpslsslppslprpspiavnatapsffhpslsnvptvppv
70 ....
70 ....n.........................
201 vsttnahnvftdqllasllpssvllqmagllqqsalagllslattpvvtp
120 ....
120 ....
251 pstscasdvlallraqqsaqlaaalglpgkntllpssspddliqtllaqt
170 ....
170 ....
301 rqpifshsl
220 ....
220 ....

```
L3i 100a    1 aansflrsdlsmaslsarq----rgalmrnkptektcgkgptmietiklk
L3i 100c    1 ...................----...........................
L3i 100b    1 -----------wsi.nc.rqrwpk...vchmks-----------rsyl..

           47 lhsdrgdaptgpstpllsaldgytedelseyrqvfnmfdidrsgaialde
           47 ..................................................
           29 ..................................................

           97 letairnlgleqtrdeldkiidevdqrgnhqidfdefcvvmrrlymkkrs
           97 .......................---------------------------
           79 ..................................................

          147 wnevvkecfnvfdrsesnviskkdfqyilrelgditdnqiideifleadv
          120 --------------....................................
          129 ..................................................

          197 dgnglidydefsymvknyltdedin
          156 .........................
          179 .........................
```

9.5 Primer und Annealingtemperaturen der *daf*- und *age*-1 spezifischen PCR

Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)	Annealingtemperatur
daf-1 for.: *	ACA GTA CCC CGA CCC TAT CC	62 °C
daf-1 rev.: *	GGA CGG AAG CTG CTA CAA	
daf-1A for.:	CCA GGC CCG CAG TCA	57,6 °C
daf-1A rev.:	CAG CAC CGT CGC CCA TTG TAA	
daf-1B for.:	TAC CAA TGT GCC GAT GTC TAC TCA	54 °C
daf-1B rev.:	ATC CCG ATC GGT CCA CTC AAT A	
daf-1C for.:	CGA GCG CCC GTT TCA CC	57,4 °C
daf-1C rev.:	ACT ATC CGC GGA GCA CCA TTT G	
daf-2 for.:	ATT GGA GGC CGT TCG CTG ATT	57,6 °C
daf-2 rev.:	GCC TGC CGT CGC CTT GAT AG	
daf-2A for.:	CGC CCG GTT GTT GTT CGT GTT C	58,4 °C
daf-2A rev.:	GTT GGA GCC GGT GTG GAT GTG G	
daf-2B for.:	TTC TCT ATC CGC GTG CCA AAA CAT	57 °C
daf-2B rev.:	TGC CGT AGC TCC CAA TCG TCT GC	
daf-3 for.: *	TTG TCA CTT CTG GGT ATC TC	47,4 °C und 47 °C
daf-3 rev.: *	CGT TCT GGG TAT GCT TCT CC	
daf-3A for.:	CGC CGC CAC ATC AAC GCT ACC	59,7 °C
daf-3A rev.:	GCA ACT CGG CCC ATT CATBTCC ATA	
daf-3B for.:	AAT TCG CTT TTC CTA CAA	50 °C
daf-3B rev.:	GAA GCG CGT CTC TGA TGA	
daf-4 for.: *	ATG ACG ACA GGC CGT ACT TC	50 °C
daf-4 rev.: *	ATG TAG CGT TTC GTT CCC AC	
daf-4A for.:	GCG CCG AGA AAA TTG GTG ATG	52,8 °C
daf-4A rev.:	AAT AAT TGG CTT CTT TGG GTG TCC	
daf-4B for.:	GCC TCG CCC GAA TCT ACA GC	56,8 °C
daf-4B rev.:	CTC GCG AAC GCA CAT CCA G	

Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)	Annealingtemperatur
daf-7 for.: *daf*-7 rev.:	GAA AAG ATC GGA TGG GAC TGG A GTT GAC ATT GGC GAT TGA GAC G	56,6 °C
daf-11 for.: *daf*-11 rev.:	AAT TGC TTT GGC TCC GTT CGT TCT TTT TCC AAT TCT GCC GTT CTA	51,4 °C
daf-11A for.: *daf*-11A rev.:	TTT TAA CGT ATT GGC TGG AAG GAG TAA TGT CTG CTG TCG TTG GAG TCG	52 °C
daf-12 for.: *daf*-12 rev.:	ACA ACT GCG GCG GAG GAA AAA TGG ATG ATG CGG TGA TAA ATG TGG	54,9 °C
daf-12A for.: *daf*-12A rev.:	CTC GCG CCA CAA CTC CAC ATC TCT TCG GCA GCA TCA CCA CCT C	55,8 °C
daf-12B for.: *daf*-12B rev.:	TGT TAC CAT GAG GCG TTT CGT C TTT GCC CCT TAA TTG TTG GTG TCT	55,6 °C
daf-14 for.: *daf*-14 rev.:	TAC CGG CAA GCA TCA ATA ATC CA AAG GTC CGA GAG CCA ATG TTT TC	54,9 °C
daf-14A for.: *daf*-14A rev.:	TTA CCG GCA AGC ATC AA GAC ATT CGG CAC TCA TCA CT	51,8 °C
daf-14B for.: *daf*-14B rev.:	TTT GGCTAA CTG TAC TGA CTG ACC CCT ATT TCC GGC CGT TCG TTA TTA	52,6 °C
daf-16 for.: *daf*-16 rev.:	GTG CGC GTC GGG CTC CTC AAT TGA TCG GTT GGC TTC TTA CG	56,3 °C
daf-16A for.: *daf*-16A rev.:	GAT CGT CGT CTC GTG TTT CTC C TAC GCA TTT GAT CAG TTC TAT	48,6 °C
daf-16B for.: *daf*-16B rev.:	ACT ACC GGG TGC CTA TGG AGA GCC GAT GAA GAA GCG ACA GTA	51,6 °C
daf-18 for.: *daf*-18 rev.:	ATT TAA GCC GGA TCC TCT CAT A GCA TCG GCG TTT CAT TTC TTC	54 °C

Bezeichnung	**Sequenz (5´→ 3´)**	**Annealingtemperatur**
daf-18A for.:	GAG TCG GTG GTC CAT TTG AGA TAC	54 °C
daf-18A rev.:	ATG CCA GAT TGC CGA ACA CTT	
daf-18B for.:	AAG GTG AAG CCG GCA ACT GAA GAC	56,6 °C
daf-18B rev.:	CCG GCC GTA TTT GGA TGGG TAT GA	
daf-18C for.:	AAA AGC CTT CGT TGA CCA GTT G	54,3 °C
daf-18C rev.:	CTT TGC CAG TTT CTT TCA CCA TTT	
daf-19 for.:	ACT ACT ATG GCA TCC GTC TGA AGG	53,2 °C
daf-19 rev.:	CGG TAG CTG CAT TGG CGG AGT GT	
daf-19A for.:	AAC AAC GCC TTC AAG CAT AAC C	55,2 °C
daf-19A rev.:	ATC GGC CAG CAA CCT AAT CAG AGT	
age-1 for.: *	GAA AAT GGA GCA AGG ATA GGC	51,2 °C und 48,2 °C
age-1 rev.: *	CAC GAT CAG TCC ACA CAA ATG	
daf-23 for.:	CGA AAT TAG AGC TCC ACG GCA CTT	55,8 °C
daf-23 rev.:	CGG GCA CGA TTC ACC AAC A	
daf-23A for.:	CGC TGG CAT CAA AAT CTA CAA CAA	54,9 °C
daf-23A rev.:	CGG CAT TCG AAC TCT ACC ACC ATA	
daf-23B for.:	ACG TCC GTT AAT GCT TCA CTG	51,9 °C
daf-23B rev.:	ACT GCG TAC GGG TTC AAA	

* nach RICKLING, 1999

9.6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
aa	Aminosäure(n) (engl.: amino acid)
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	lat.: Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
AP	alkalische Phosphatase
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C 1 bzw. C 2R	Kontroll-DNA 1 bzw. Kontroll-DNA 2
Ca^{2+}	Kalzium
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA, copy DNA)
CDS Primer	cDNA-Synthese Primer
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guaosinmonophosphat
C : I	Chloroform:Isoamylalkohol
cm	Zentimeter
Ct	Cycle threshold
CV	Variationskoeffizient (engl.: coefficient of variance)
daf	*dauer formation*
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	didesoxy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguaosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidinintriphosphat

dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dRn	normalisierte Baseline-korrigierte Fluoreszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	lat.: et alii
FAM	Carboxy-Fluoreszin
G	Guanin
g	Gravitationskonstante
GC	Guanylyl-Cyclase
GMP	Guanosinmonophosphat
GSP	genspezifischer Primer
GTC	Guanidinium Thiocyanat
HCl	Salzsäure
HSM	humane Skelettmuskulatur
$iPLA_2$	Kalzium-unabhängige Phospholipase A_2
kb	Kilobasen
l	Liter
µl	Mikroliter
L3	dritte Larven
L3i	inhibierte dritte Larven
L3ni	nicht inhibierte dritte Larven
LB	Luria-Bertani
LD	lange Distanz (engl.: long distance)
M	molar (Mol/Liter)
µM	mikromolar
ME	Mercaptoethanol
MGB	minor groove binder
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MMLV	*murine moloney leukemia virus*
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NH_4OAc	Ammoniumacetat
NaOH	Natriumhydroxid

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (engl.: nitric oxide)
OD	optische Dichte
P:C:I	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionen-Konzentration
PNMT	Phenylethanol-N-Methyltransferase
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
ROX	Carboxy-X-Rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
S	Svedberg
SOD	Superoxiddismutase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
Taq	*Thermus aquaticus*
TK	Testerkontrolle
TNE	Tris-Acetat-NaCl-Puffer
U	Unit (Enzymeinheiten)
UPM	Universelle Primermischung (engl.:Universal Primer Mix)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett

9.7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Schnieder danke ich für die Überlassung des Themas, die stets freundliche Beratung und die jederzeit bestehende Möglichkeit eines Gesprächs sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn PD Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna sei herzlich für alle fachlichen Anregungen und Hilfestellungen, die fruchtbaren Diskussionen und für sein Einfühlungsvermögen gedankt.

Frau Sandra Buschbaum danke ich für die geduldige Einarbeitung, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Motivation. Auch sei Frau Ursula Küttler für ihre helfenden Hände unter anderem beim Sammeln der „Luwus“ gedankt. Beiden danke ich weiterhin ganz herzlich für die vielen persönlichen Gespräche und die freundschaftliche Atmosphäre.

Frau Meike Stoverock danke ich für die vielen fachlichen und persönlichen Diskussionen und ihre Freundschaft beim Durchleben von Höhen und Tiefen.

Den Doktoranden des Instituts für Parasitologie, Frau Dr. Friederike Krämer und Herrn Dr. Christian Epe sei für die vielen Gespräche und das fast immer erfolgreiche Bemühen, mich auch an einem schwarzen Tag zum Lachen zu bringen, gedankt.

Frau Katrin zum Felde danke ich ganz herzlich für ihre Hilfe bei der Literaturbeschaffung und die Einweisung in den Reference Manager.

All meinen Freunden danke ich für das Verständnis für Zeitmangel in „heißen Phasen“, das Beistehen in dunkelsten Momenten und für die unbeschwerten Zeiten voller Spaß.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre Liebe, ihren Rückhalt, ihre Unterstützung in allen Lebensbereichen und so viel mehr. Ohne Euch wären manche Täler tiefer gewesen...